

---

# **BACHELORARBEIT**

---

Frau  
**Doreen Kropp**

## **Vergleichende Genanalyse zur Identifizierung human- pathogener, allergener und toxinogener Pilze**

Mittweida, 2011

# **BACHELORARBEIT**

---

## **Vergleichende Genanalyse zur Identifizierung human- pathogener, allergener und toxinogener Pilze**

Autor:  
**Frau  
Doreen Kropp**

Studiengang:  
**Biotechnologie/Bioinformatik**

Seminargruppe:  
**BI08w1 b**

Erstprüfer:  
**Pro. Dr. rer. nat. Dirk Labudde**

Zweitprüfer:  
**Dr. Werner Brabetz**

Einreichung:  
**Mittweida, 22.August.2011**

Verteidigung/Bewertung:  
**Mittweida, 2011**

## **Bachelor THESIS**

---

# **Comparative genetic analysis for identification of human- pathogene, allergene and toxic fungi**

author:

**Ms.**

**Doreen Kropp**

course of studies:

**Biotechnologie / Bioinformatics**

seminar group:

**BI08w1 b**

first examiner:

**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde**

second examiner:

**Dr. Werner Brabetz**

submission:

**Mittweida, 22.August.2011**

defence/ evaluation:

**Mittweida, 2011**

## **Bibliografische Beschreibung:**

Kropp, Doreen:

Vergleichende Genanalyse zur Identifikation humanpathogener, allergener und toxinogener Pilze. - 2011. - 66 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät <Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, 2011

## **Referat:**

In dieser Arbeit wird die Erstellung eines Datenpools beschrieben. Dieser beinhaltet Sequenzdaten eines zuvor ausgewählten Zielgens (rRNA-Operon). Es wird die Generierung der Datenbank und die Qualitätssicherung der Sequenzen erläutert. Ebenso sind erste Anwendungen des Datenpools, als Grundlage für die artspezifische Identifizierung von medizinisch relevanten Pilzen aufgezeigt.

# Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. Labudde, der mir während der Bachelorzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich mit zahlreichen Tipps und Anregungen und noch mehr Geduld unterstützt hat.

Mein Dank geht auch an die Firma Biotype Diagnostic GmbH, die mir dieses Bachelorthema ermöglicht hat und besonders an Dr. W. Brabetz, der mir durch sein Fachwissen und seine Anregungen sehr oft weitergeholfen hat.

Auch danke ich meinem Kommilitonen, der sich bereit erklärt hat meine Bachelorarbeit mehrfach zu lesen, sich nicht gescheut hat Kritik zu üben und Verbesserungsvorschläge vorzubringen und mir auch immer freundschaftlich zur Seite stand.

Weiterhin danke ich meinem Freund Robert, der mir die Zeit zum arbeiten lies.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer und tiefer Dank meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir in allen Lebenslagen zur Seite standen.

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Pilze	3
2.1 Systematik	3
2.2 Pilzerkrankungen	6
2.2.1 Dermatophyten	7
2.2.2 Hefen	8
2.2.3 Schimmelpilze	9
2.3 Nachweismethoden	10
2.3.1 konventionelle Methoden	10
2.3.1.1 Mikroskopie und Kultur	10
2.3.1.2 Serologische Untersuchungen	11
2.3.1.3 Bildgebende Verfahren	11
2.3.2 Molekularbiologische Methoden	12
2.4 Zielensequenzen	14
2.4.1 Cytochrom-Oxidase	14
2.4.2 $\beta$ -Tubuline	16
2.4.3 Chitin Synthase	17
2.4.4 rRNA Operon	17
2.5 Ziel des Projektes	20
3 Erstellung des Datenpools	21
3.1 Auswahl des Zielgens	21
3.2 Zielgenrecherche	21
3.3 Assemblieren der recherchierten Sequenzdaten	23
3.4 Verarbeitung der Daten	24
3.5 Erstellen phylogenetischer Bäume	25
4 Ergebnisse	27
4.1 rRNA als Zielgen	27
4.2 Alignierung und Assemblierung der Sequenzdaten	28
4.3 Auswertung der Sequenzalignments	31
4.4 Interpretation und Anwendung auf verschiedene Fragestellungen	33
5 Diskussion	43
6 Zusammenfassung/Ausblick	51
7 Anlage	A-I
9 Literaturverzeichnis	61
10 Erklärung	69

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einordnung der Pilze im Reich der Eukaryonten [66]	4
Abbildung 2: phylogenetischer Baum aller Pilze entwickelt durch das AFTOL Projekt [3][17]	5
Abbildung 3: <i>Candida albicans</i> in mikroskopischer Aufnahme.	9
Abbildung 4: Cytochrom Oxidase [54]	15
Abbildung 5: Anordnung von $\alpha$ - und $\beta$ -Tubuline eines Mikrotubuli [11]	16
Abbildung 6: rRNA-Operon [68]	19
Abbildung 7: Schema zur Auswahl und Assemblierung von Sequenzdaten	23
Abbildung 8: graphische Übersicht zum Vorkommen von Sequenzen aller Zielgenen in Datenbanken	28
Abbildung 9: MSA der Einträge von <i>Penicillium griseoflavum</i>	29
Abbildung 10: Beispielassemblierung anhand <i>Penicillium griseoflavum</i>	30
Abbildung 11: Überblick des MSA aller Organismen des Datenpools	32
Abbildung 12: Ausgangsbaum mit verschieden farbig eingeteilten Organismengruppen	34
Abbildung 13: Ausschnitt aus 18S Bereich des MSA mit stark konservierten Bereich der dunkelblauen Gruppe	34
Abbildung 14: Ausschnitt aus 28S Bereich des MSA mit stark konservierten Bereich der dunkelblauen Gruppe	35
Abbildung 15: phylogenetischer Baum nach Zusammenfassen einiger Organismengruppen	35
Abbildung 16: Abgrenzung der Pilzgattungen: Schimmelpilze (schwarz), Dermatophyten (grün), Hefen (blau)	36
Abbildung 17: Übersicht des MSA aller Organismen die für die Candida Identifizierung nötig sind	38
Abbildung 18: Candida Baum	39
Abbildung 19: Ausschnitt aus MSA mit rDNA Sequenzen von 5' $\rightarrow$ 3'	40
Abbildung 20: Graphik zur Datenlage des rDNA Operons	44
Abbildung 21: phylogenetischer Baum aller assemblierten Organismen	A-IX

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organismen nach dem DHS-System	7
Tabelle 2: Zusammensetzung der Ribosomen in Eukaryonten	18
Tabelle 3: Übersicht der forward und reverse Primer zur Candida Identifizierung	41
Tabelle 4: Verteilung der Zielgene in Datenbanken – Dermatophyten	A-II
Tabelle 5: Verteilung der Zielgene in Datenbanken – Hefen	A-II
Tabelle 6: Ein- und Ausschlussorganismen	A-III
Tabelle 7: Verteilung der Zielgene in Datenbanken – Schimmelpilze I	A-III
Tabelle 8: Verteilung der Zielgene in Datenbanken – Schimmelpilze II	A-IV
Tabelle 9: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Dermatophyten	A-V
Tabelle 10: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Hefen	A-V
Tabelle 11: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Schimmelpilze I	A-VI
Tabelle 12: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Schimmelpilze II	A-VII
Tabelle 13: nicht assemblierte Sequenzeinträge	A-VIII



## Abkürzungsverzeichnis

<AFTOL>	<Assembling the Fungal Tree of Life>
<BLOSUM>	<BLOcks SUBstitution Matrix>
<bp>	<Basenpaare>
<DDBJ>	<DNA Data Bank of Japan>
<DHS-System>	<Dermatophyten Hefen Schimmelpilz - System>
<EBI>	<European Bioinformatics Institute>
<EC-Nummer>	<Enzyme Commission numbers>
<ELISA>	<Enzyme-linked immunosorbent assay>
<EMBL>	<European Molecular Biology Laboratory>
<EORTC/MSG>	<European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group>
<ETS>	<external transcribed spacer>
<fwd.>	<forward>
<ITS1>	<internal transcribed spacer 1>
<ITS2>	<internal transcribed spacer 2>
<LD50>	<mittlere letale Dosis>
<LSU>	<large subunit>
<mRNA>	<messenger RNA>
<MSA>	<Multisequenzalignment>
<NCBI>	<National Center for Biotechnology Information>
<NTS>	<non transcribed spacer>
<PCR>	<polymerase chain reaction/Polymerase Kettenreaktion >
<PHYLIP>	<PHYLogeny Inference Package >
<rDNA>	<ribosomale DNA>
<rev.>	<reverse>
<rpb1>	<RNA polymerase II subunit B1>
<rpb2>	<RNA polymerase II subunit B2>
<rRNA>	<ribosomale DNA>
<rt-PCR>	<real-time polymerase chain reaction>
<S>	<Svedberg>
<spp.>	<mehrere Arten/Species >
<SSU>	<small subunit>
<tef1>	<Translational elongation factor EF-1 alpha>
<tRNA>	<transfer-RNA>
<UPGMA>	<Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean>

# 1 Einleitung

Pilze sind eukaryontische Organismen, die beinahe jede ökologischen Nische besiedeln. Hauptsächlich sind sie frei lebende Saprophyten, die eine Hauptaufgabe in der Erhaltung des Mikroklimas in der Umwelt haben. Ihre Vielfalt reicht von mikroskopisch kleinen, wenigen Nanometer großen Zellen bis hin zu makroskopisch erkennbaren Fruchtkörpern (z.B. Morchella) von Hut- und Ständerpilzen. Von den ca. 1,5 Millionen Pilzarten [14][32] wirkt nur eine geringe Anzahl beim Menschen obligat krankheitserregend (humanpathogen). Daneben gibt es opportunistische Pathogene, die besonders auf prädisponierte Organismus eine schädliche Wirkung haben können. Zu dieser Gruppe gehören neben den Vertretern der Hefen auch die Schimmelpilze. Humanpathogene Pilze können durch drei Hauptmechanismen Krankheiten verursachen: Allergische Reaktionen durch Pilzantigene, Wirkung von Pilzgiften (Mykotoxine) und Infektionen (Mykosen). Die häufigsten Erkrankungen sind, neben allergischen Reaktionen auf Schimmelpilzsporen, die Pilzinfektionen. Sie reichen von oberflächlichen Mykosen über subkutane Mykosen bis hin zu systemischen Mykosen. [42]

Die systemische Mykosen stellen in der Praxis die größte Schwierigkeit dar, da es zu einem Befall der inneren Organe kommt. Damit sind sie nur schwer von anderen bakteriellen Infektionen abzugrenzen und ebenso schwer nachzuweisen. Der Nachweis der Erreger erfolgt vor allem durch konventionelle Methode, wie Mikroskopie oder mikrobielle Kulturen. Deren Durchführung ist aufwendig, zeitraubend und nur durch erfahrenes Personal durchzuführen. Da die Differenzierung der Erreger hauptsächlich mikro- und makroskopisch geschieht, ist eine eindeutige Differenzierung meist nur schwer oder überhaupt nicht möglich. Auch serologische Untersuchungen oder Blutkulturen ergeben keine eindeutigen Ergebnisse.

An dieser Stelle ist eine zunehmende Entwicklung molekularbiologischer Methoden zu beobachten [60], die die Erreger-DNA im Untersuchungsmaterial in einem Direkt-nachweis detektieren. Diese Methoden basieren überwiegend auf der Polymerase-Ketten-reaktionen (PCR) mit anschließender Detektion. Ebenso stark wie die Anzahl der Detektionsmethoden, können auch die Abwandlungen der PCR Verfahren variieren. Es sind Identifikationsmethoden bekannt, die rt-PCR [1], nested PCR [10] [41], semi-nested PCR [18][23] oder konventionelle PCR [4][22][24] nutzen. Jedoch ist noch keine Variante in der Lage in ein mykologisches Routinelabor einzuziehen, da sie zumeist nicht standardisierbar sind [40] und vor allem mit Kontaminationsproblemen kämpfen. [64]

In Zusammenarbeit mit der Firma Biotype Diagnostic GmbH in Dresden sollten in der folgenden Arbeit die theoretischen Grundlagen für solch ein molekularbiologischen Nachweis erarbeitet werden. Er beruht auf der Amplifikation eines Zielgens (PCR) und anschließend die Erregeridentifikation auf Artebene. Dazu wurde in diesem Teilprojekt ein Datenpool erstellt, der eine große Anzahl an medizinisch relevanten Pilzorganismen enthält. Taxonomisch wurden diese Pilze den Abteilungen der Ascomyceten und Zygomyceten zugeordnet und liegen verwandtschaftlich sehr nah beieinander. Daher werden Zielgensequenzen betrachtet und Algorithmen genutzt, die in phylogenetischen Studien bereits erfolgreich erforscht und angewendet worden waren. Ebenfalls werden erste Ansätze für effiziente Nachweisverfahren gezeigt, die eine hohe Spezifität und Sensitivität versprechen und in der Routinediagnostik anwendbar sind.

## 2 Pilze

### 2.1 Systematik

Das Reich der Pilze umfasst bisher ca. 712.000 Arten [35], doch geschätzt liegt die Zahl bei mehr als 1,5 Millionen. [14][51] Davon beschreibt das „Tree of Life Web Project“ allerdings nur ca. 70.000 Pilze als bekannt und erforscht. [67]

Pilze zählten eine lange Zeit zum Reich der Pflanzen, da sie sowohl Zellwände als auch Vakuolen besitzen und eine sesshafte Lebensweise aufweisen. Allerdings fehlt den Pilzen das Chlorophyll, wodurch Pflanzen Photosynthese betreiben. Pilze haben eine heterotrophe (genauer chemoorganotrophe) Lebensweise, da sie Energie aus der chemischen Umsetzung von organischen Stoffen gewinnen. Ebenso besteht ihre Zellwand aus Chitin, während die der Pflanzen u.a. aus Zellulose aufgebaut ist. [51]

Heute bilden die Pilze ein eigenes Reich. [20] Anhand umfangreicher molekularbiologischer Untersuchungen, wie der 18S rRNA-Analyse, fand eine Neugruppierung der Pilze in ihrer systematischen Einordnung statt. Eine der bedeutendsten Studien war das Projekt des „Assembling the fungal tree of life“ (AFTOL [56]), das die Phylogenie (Stammesgeschichte) im Reich der Pilze weiterentwickelte. In diesem Projekt wurden vier Gene untersucht (nukleare rRNA Gene und Protein-codierenden Loci: *tef1*, *rpb1*, *rpb2*). [3][17] Durch die Analyse mit aktuellen phylogenetischen Algorithmen resultierte die nach dem heutigem Stand modernste phylogenetische Aufzeichnung der Pilze. [20]

Demnach sind sie eine Schwestergruppe der Tiere (vgl. Abb. 1), mit denen sie auch einige morphologische und physiologische Gemeinsamkeiten aufweisen. Dabei wird die Unterscheidung zu Tieren auf zellulärer Ebene getroffen. [51] Sie besitzen gemeinsam mit den Tieren die chemoorganotrophe Ernährungsweise. So sind sie in der Lage, hydrolytische Enzyme zum Abbau von polymeren Nährstoffen für ihren Stoffwechsel zu bilden. Ebenso besitzen beide Chitin in ihrer Zellwandstruktur [51] und Glykogen zur Kohlenhydratspeicherung. [29]

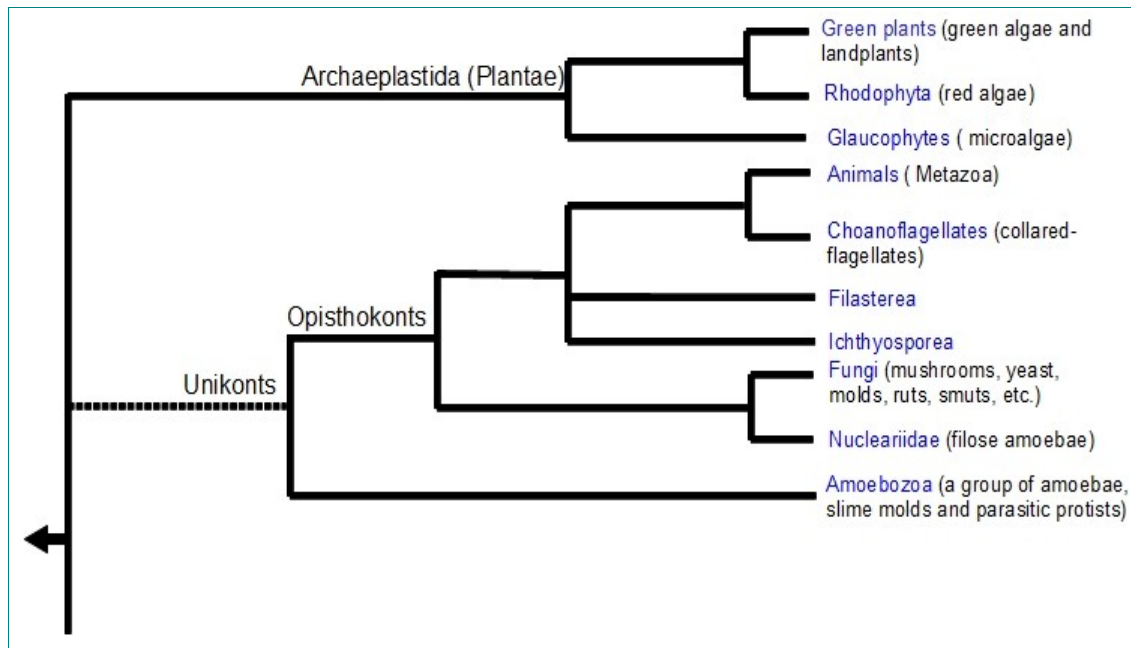


Abbildung 1: Einordnung der Pilze im Reich der Eukaryonten [66]

Anhand der Arbeit des „Assembling the fungal tree of life“ Projektes lässt sich das Reich der Pilze in mindestens acht Phyla gliedern (vgl. Abb. 2). Davon beherbergen die Basidiomycota und die *Ascomycota* etwa 95 % aller bekannten Pilze. [51] Sie bilden zusammen das Taxon Dikarya.

Die medizinisch relevanten humanpathogenen Pilze gehören der Abteilungen *Zygomycota* (Jochpilze) und *Ascomycota* (Schlauchpilze) an.

Die *Ascomycota* sind einzellige oder fädige Organismen, die in zahlreichen Habitaten in großer Zahl vorkommen. Dazu zählen die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), die umgangssprachlich als „Schimmelpilze“ bezeichnete Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Alternaria* sowie größere Vertreter, wie die Morchel (*Morchella*) oder die beliebten Trüffel. [51] Die *Zygomycota* sind fast ausnahmslos landlebend. Sie finden sich überwiegend in Böden. Zu ihnen gehört beispielsweise der „Gemeine Brotschimmel“ (*Rhizopus stolonifer*) oder der sogenannte Köpfchenschimmel (*Mucor spp.*).

Diese Abteilungen der Pilze gewinnen mehr und mehr an Bedeutung, da sie neben ihrer Aufgaben im Ökosystem auch zunehmend in verschiedenen Bereiche der Biotechnologie (Herstellung von Lebensmitteln, Antibiotika, Proteinen u. v. m.) eingesetzt werden. Ebenso rufen sie zahlreiche Krankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen hervor.

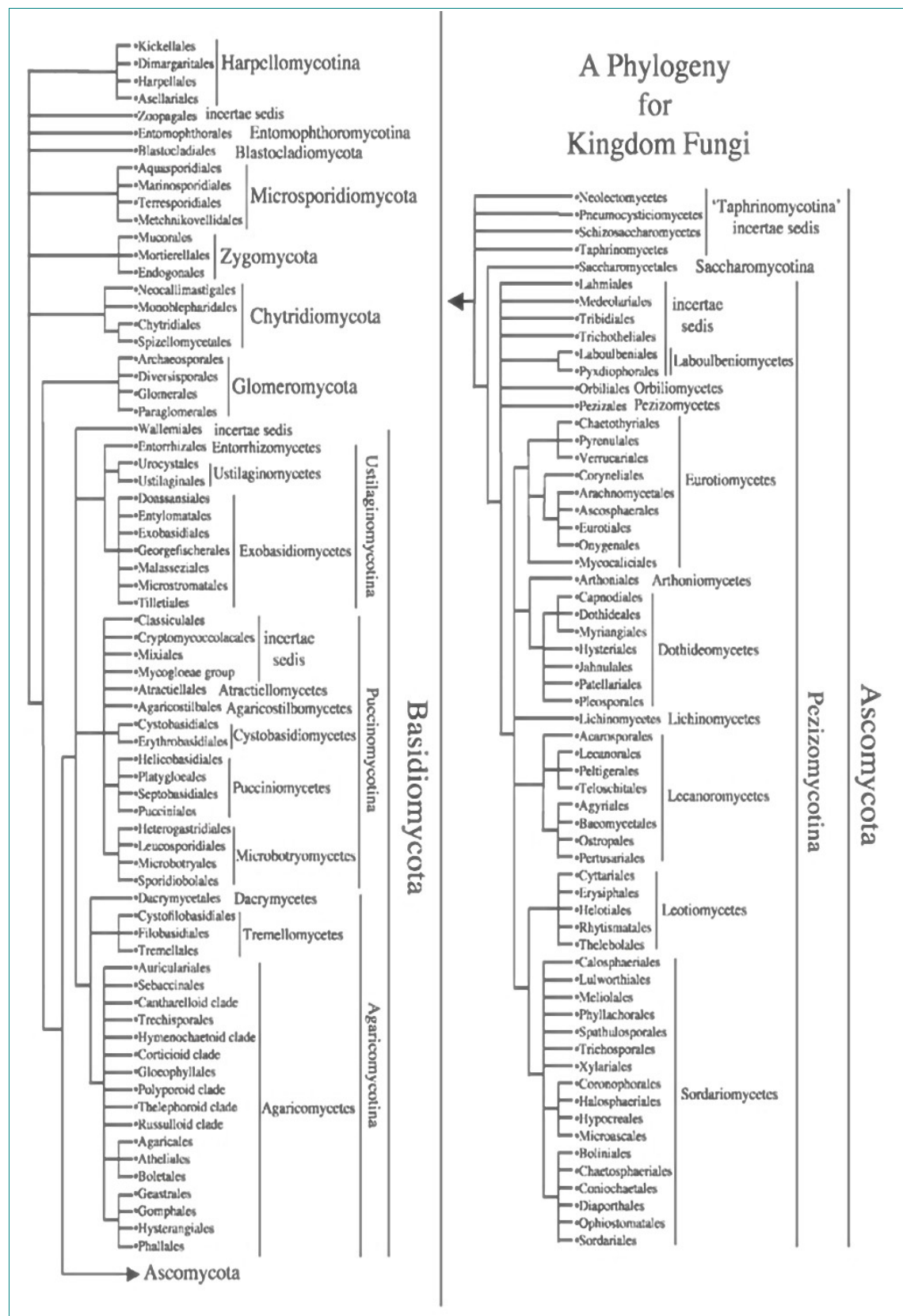


Abbildung 2: phylogenetischer Baum aller Pilze entwickelt durch das AFTOL Projekt [3][17]

## 2.2 Pilzerkrankungen

Durch eine heterotrophe Lebensweise sind Pilze in der Lage organische Verbindungen für ihren Energiestoffwechsel zu nutzen. Damit können sie zahlreiche Habitate besiedeln und kommen fast überall vor: In Luft und Boden, in Nahrungsmitteln, sogar auf Kunststoffen, aber auch im menschlichen Körper. [42]/S.1032 Dort herrscht natürlicherweise ein Gleichgewicht zwischen den vorhandenen Mikroorganismen, so dass die Anwesenheit der Pilze als Teil der Mikroflora noch keine Erkrankung hervorruft. Ist dieses Gleichgewicht gestört kommt es zu Erkrankungen. Sie reichen von Allergien über Infektionen bis hin zu Vergiftungen (Mykotoxine). Allergische Reaktionen werden meist durch Pilzsporen hervorgerufen, welche sich über den Luftweg in der Umwelt verteilen. Mykotoxine werden dagegen vom Pilz selbst, als Abwehr-mechanismus gegen andere Keime, produziert. Besonders bekannt ist das Aflatoxin B1 des *Aspergillus fumigatus*. Bereits kleinste Mengen führen zu DNA- und Leberschäden und es ist eine der am stärksten krebserregenden Substanz ( $LD_{50} = 1-10 \text{ mg/kg}$ , oral). [57] Infektionen, hervorgerufen durch Pilze, werden als Mykose bezeichnet. [50] Die Einteilung dieser Mykosen kann grob anhand der Lokalisation getroffen werden [42]:

- kutan, oberflächliche Mykosen (betrifft Haut, Schleimhaut, Nägel, Haare)
- subkutan, betrifft tiefere Hautschichten
- systemische Mykosen, Befall der inneren Organe

In der medizinischen Mykologie wird eine vereinfachte morphologische Unterteilung vorgenommen [53], da sowohl allergische Reaktionen, Vergiftungen als auch Mykosen als Erkrankungen auftreten und diese nicht auf eine Organismengruppe begrenzt werden können. Die Unterteilung erfolgt nach dem DHS-System (nach Rieth) [33] in:

- Dermatophyten (D)
- Hefen (H)
- Schimmelpilze (S)

Dermatophyten	Hefen	Schimmelpilze
Fakultativ pathogene Erreger, Obligat pathogene Erreger befallen auch gesunden Menschen; z.B. Fußpilz, Nagelmykosen	Verursachen nur opportunistische Infektionen (Mykosen, Allergie)	Verursachen opportu- nistische Infektionen (Mykosen, Allergie, Vergiftung)
<i>Microsporum canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Malassezia furfur</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium griseofulvum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>

Tabelle 1: Organismen nach dem DHS-System

In Tabelle 1 ist eine Übersicht mit typischen Erregern und deren pathogener Wirkung auf den menschlichen Organismus dargestellt. Die Klassifizierung der Pilze nach dem DHS-System nach Rieth hat sich in der Praxis sehr gut bewährt.

### 2.2.1 Dermatophyten

Dermatophyten bilden keine taxonomische Einheit in der Systematik der Pilze. Sie gehören zu der Familie der *Arthrodermataceae* in die Abteilung der *Ascomycota*. Es sind keratinophile Fadenpilze, die spezifische Pilzinfektionen der Haut und Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel), auch bei gesunden Menschen, hervorrufen. Die Erkrankungen werden als Dermatomykosen bezeichnet. [13] Mykosen der Haut und hautnahen Schleimhäute gehören weltweit zu den häufigsten Infektionskrankheiten. [53] Bis heute sind 38 Arten tier- und humanpathogener Dermatophyten bekannt. [48] Diese gehören zu den Gattungen *Epidermophyton*, *Microsporum* und *Trichophyton* (vgl. Tabelle 1).



### 2.2.2 Hefen

Diese einzelligen Pilze, welche sich vegetativ durch Sprossung oder Spaltung vermehren, werden auch als Sprosspilze bezeichnet. Die meisten gehören taxonomisch zur Abteilung der *Ascomycota* in die Klasse der *Saccharomycetes*. [[47]/S.666] Sie besiedeln natürlicherweise die Schleimhäute (Mund, Nase, Darm, Urogenitaltrakt) des Menschen, rufen dort aber keine Erkrankungen hervor. Im allgemeinen werden sie durch das Immunsystem und die natürliche Flora an einer übermäßigen Vermehrung gehindert. Erst durch eine Schwächung des Immunsystems (Antibiotikagabe, Chemotherapie, AIDS) wird für die Hefen ein Überlebensvorteil geschaffen. [12][26][45]

Vertreter für Hefen sind hauptsächlich *Candida*-Arten wie *Candida albicans* (Abb. 3), aber auch Organismen der Gattung *Malassezia*, *Exophiala*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* und die, als Modellorganismus bekannte, *Saccharomyces cerevisiae* spielen eine medizinisch relevante Rolle. Die Krankheitserscheinungen gehen von oberflächlichen Mykosen (Haut- und Nagelmykosen), allergischen Reaktionen (Dermatitis von *Malassezia furfur*) bis hin zu systemischen Mykosen wie Soor, Pneumonie, Peritonitis oder *Candida*-Sepsis. [45]

Mehr als 100 Hefe-Arten wurden als humanpathogen identifiziert. [26] Die häufigsten Erreger schwerer Pilzerkrankungen sind unter anderem die *Candida*-Arten. Sie leben im menschlichen Körper als harmlose Saprophyten. Einfache, oberflächliche *Candida*-mykosen an Schleim- und Bindehäuten, feuchten Hautfalten und Nagelfalten sind problemlos zu identifizieren, zu behandeln und heilbar. Anders bei Organ-Candidosen und generalisierten Infektionen. Diese entstehen bei Menschen mit geschwächter Abwehrlage und betreffen vor allem Lunge, Herz und Darm. Systemische Candidosen enden in etwa 70 % der Fälle tödlich. Besonders gefährlich ist die *Candida*-Sepsis, bei der eine große Zahl Erreger im Blut zu finden ist. In Deutschland sind jedes Jahr etwa 40.000 Menschen von dieser invasiven *Candida*-Infektion betroffen. Bei den Krankenhausinfektionen steht der Hefepilz inzwischen auf Platz vier der Liste der gefährlichsten Erreger. [19]



Abbildung 3: *Candida albicans* in mikroskopischer Aufnahme.

### 2.2.3 Schimmelpilze

Der Begriff Schimmelpilz umfasst umgangssprachlich eine Gruppe von Pilzen, die ausnahmslos terrestrisch leben und ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Es sind filamentöse Pilze, die in der Lage sind, über ihre vegetativen Fruchtkörper eine große Menge an Sporen in die Luft abzugeben und sich so über weite Strecken auszubreiten. Aufgrund ihrer anspruchslosen, saprophytischen Lebensweise gedeihen auch sie fast überall. [[47]/S.18] Sie gehören überwiegend zur taxonomischen Gruppe der *Ascomycota* und *Zygomycota*. Schimmelpilze haben in der Natur die Funktion der Destruenten, bauen also organischen Materialien ab. Dies hat nicht nur positiven Nutzen sondern verursacht auch Schäden. So können beispielsweise ganze Ernten durch den Befall mit der Schimmelpilzgattung *Fusarium* vernichtet werden. [[47]/S.13] Vor allem die humanpathogene Wirkung der Schimmelpilze stellt ein großes Problem dar, da nicht nur die Sporen der Pilze gesundheitsschädlich sind, sondern auch seine Stoffwechselprodukte (Mykotoxine) und Zellbestandteile.

Erkrankungen, die durch Schimmelpilze verursacht werden, sind sehr vielfältig. Sie können allergische Reaktionen, durch die Aufnahme von Pilzsporen, hervorrufen oder Vergiftungen, durch Zellbestandteile und Mykotoxine, bewirken. Ebenso können sie opportunistische Infektionen bei empfindlichen oder immungeschwächten Patienten verursachen. (vgl. Tab. 1) Auch hier sind die schweren Verlaufsformen die systemischen Mykosen. Darunter zählen invasive Aspergillose, Aspergillom und Zygomycose, die innerhalb von wenigen Tagen zum Tod des Patienten führen können.[45]

Um diesen Pilzerkrankungen vorzubeugen und sie gezielt therapieren zu können müssen sowohl sensitive Nachweismethoden als auch Methoden mit hoher Spezifität entwickelt werden, die in der Routinediagnostik anwendbar sind. Neben den konventionellen Methoden spielen zunehmend auch molekularbiologische Nachweisverfahren eine Rolle, da hier die Erreger DNA direkt nachgewiesen wird. Im nächsten Abschnitt werden zunächst konventionelle Methoden erläutert und im folgenden Vor- und Nachteile von molekularbiologischer Methoden aufgezeigt.

## **2.3 Nachweismethoden**

### **2.3.1 konventionelle Methoden**

Die Diagnose von Mykosen erfolgt routinemäßig durch traditionelle Diagnoseverfahren. Diese beinhalten neben Nativpräparaten (Mikroskopie) und der Aufzucht (Kultivierung) des Erregers auch serologische Untersuchungen und bildgebende Verfahren.

#### **2.3.1.1 Mikroskopie und Kultur**

Anhand der Mikroskopie erfolgt ein Direktnachweis des Erregers. Dazu werden in erster Linie Nativpräparate genutzt, dass heißt mikroskopisch betrachtet. Dort gilt der Nachweis von Sprosspilzzellen (Hefe) oder Myzelien (Schimmelpilz / Dermatophyten) als erstes Indiz für eine Pilzerkrankung. Um einen Verdacht zu bestätigen wird in der Regel eine Kultur angelegt. Abhängig von der Herkunft des Untersuchungsmaterials wird der Erreger in Blutkulturen oder auf Nährböden kultiviert. Die gebräuchlichsten Nährböden sind dabei Kimmig-Agar und Sabouraus-(2%)-Glucose-Agar mit einem Antibiotikazusatz, um die bakterielle Begleitflora abzutöten. Wenn eine Kultivierung gelungen ist wird die Probe ebenso mikroskopisch und makroskopisch betrachtet und

deren Morphologie (Beschaffenheit, Koloniegröße und -farbe, Makro- und Mikrokonidien, Hyphen und Sporenformen) beurteilt. [45] Allerdings ist eine Identifikation des Erregers anhand dieser Methoden sehr zeitaufwendig (3-10 Tage, Dermatophyten 4-6 Wochen [10]) und unspezifisch. Sie werden stark vom Wachstumsverhalten der Pilze, deren morphologischen Merkmalen und ebenso von der Erfahrung des Laborpersonals beeinflusst.

### **2.3.1.2 Serologische Untersuchungen**

Pilzkulturen sind nicht immer eindeutig. Schwierigkeiten liegen vor allem bei der Betrachtung nah verwandter Arten und auch beim Untersuchungsmaterial, das nicht immer aus sterilen Körperflüssigkeiten stammt. Es müssen also andere Methoden zur Identifizierung genutzt werden. Die serologischen Nachweisverfahren sind solche eine weitere Möglichkeit zum Erregernachweis. [46] Sie beinhalten den Antikörpernachweis als Reaktion des Körpers auf die Infektion und den Nachweis spezifischer Zellwandkomponenten (Antigene) des Erregers.

Dabei spielt der Antikörpernachweis eine untergeordnete Rolle, da der Körper erst nach längerer Zeit nach Ausbruch der Krankheit Antikörper bildet, wenn überhaupt bei immunsupprimierten Patienten. Außerdem verbleiben Antikörper im Körper nach der Heilung der Krankheit, so dass sie auch bei gesunden Menschen nachgewiesen werden können. So kann dieses Verfahren lediglich zur Therapiekontrolle (Titerkontrolle) verwendet werden. Die interessantere Variante ist der Antigennachweis. Hier werden Zellwandbestandteile wie Galaktomannan oder  $\beta$ -D-Glucan mittels ELISA detektiert. [64] Allerdings können Kreuzreaktionen mit anderen Erregern nicht ausgeschlossen werden und es gelingt meist kein serologischer Nachweis zu Lebzeiten des Patienten. [46]/S.374] Auch ist keine serologische Nachweismethode zur Identifizierung der Pilzspezies in der Lage. [64]

### **2.3.1.3 Bildgebende Verfahren**

Diese Verfahren werden vorwiegend bei invasiven Pilzinfektionen genutzt. Darunter zählen Röntgenaufnahmen, Computertomographien, Magenspiegelungen oder Ultraschall. Allerdings ergeben diese Verfahren erst signifikante Ergebnisse bei fortgeschrittener Erkrankung, was einer schnellen und gezielten Therapie entgegen steht. In Kombination mit den bildgebenden Verfahren werden oft histologische Untersuchungen aus Biopsien verdächtiger Läsionen gemacht. Und auch hier kann die Erregerspezies oft nicht nachgewiesen werden. [64]

Zusammenfassend sind konventionelle Methoden sehr zeitaufwändig, unspezifisch und mit geringer Sensitivität. Sie bieten keine verlässliche und vor allem frühzeitige Diagnose der Pilzerkrankung. So werden Patienten im Klinikalltag meist vorsorglich, unabhängig von der Art des Erregers, mit Antimykotika behandelt. [64]

Um dem Vorzubeugen werden zunehmend molekularbiologische Methoden entwickelt. Mit ihnen ist es möglich, organismenspezifische DNA nachzuweisen und in relativ kurzer Zeit den Pilzerreger zu identifizieren.

### **2.3.2 Molekularbiologische Methoden**

Molekularbiologische Methoden gewinnen immer mehr an Bedeutung, finden aber bisher kaum Eingang in die Routinediagnostik. Zurzeit werden hauptsächlich semiautomatisierte Amplifikationsverfahren, genauer verschiedene PCR-Varianten, genutzt um einzelne Pilzarten zu identifizieren. Oft sind diese zusätzlich mit Detektionsverfahren gekoppelt, damit ein gezielter und breitgefächter Nachweis von Pilzpathogenen möglich wird. Diese Möglichkeiten umfassen zum Beispiel DNA-Sonden (Chiptechnologie [60], Enzyme (PCR-ELISA [8]) oder Fluoreszenzmarkierungen (rt-PCR, Kapillarelektrophorese). Vorteile dieser Methoden liegen in der hohen Sensitivität durch den direkten Nachweis der Pilz-DNA aus dem Untersuchungsmaterial. Ebenso gelangt man zu schnellen Ergebnissen, da die Untersuchung bereits an jungen Pilzkulturen durchgeführt werden können. Es müssen also nicht mehr die Ausprägung der vollen phänotypischen Merkmale des Pilzes, wie dem mikroskopischen Nachweis, abgewartet werden. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von PCR-Assays entwickelt, welche schon gut erprobt aber noch nicht standardisierbar sind. Daher werden sie von der EORTC/MSG bisher nicht als Kriterium für beispielsweise invasive Pilzinfektionen akzeptiert. [31] [64]

Ebenso problematisch gestaltet sich die Tatsache der falsch positiven Ergebnisse. Diese treten überwiegend durch Kontaminationen auf. Da diese molekularbiologischen Verfahren eine sehr hohe Sensitivität besitzen, werden bereits kleinste Mengen an Pilz-DNA nachgewiesen, so dass dieser Nachweis vor allem anfällig für die Kontaminationen der Proben mit Pilzsporen aus der Luft ist. [28] Auch sind die Reagenzien und Materialien nicht frei von Pilz DNA, da Sterilisationsverfahren keine Pilz-DNA erfassen. Diesem Problem kann nur mit aufwendigen und umfangreichen Kontrollen entgegen gewirkt werden. [64]

Aktuell geht der Trend zu dem Verfahren der rt - PCR. [65] Es ist eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR und verkürzt den Analysegang um einige

Stunden. Neben der Detektierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen ist zusätzlich eine Quantifizierung der Pilz-DNA möglich. Ebenso ist die Kontaminationsgefahr der Proben geringer, was die Ergebnisse zuverlässiger macht. [65]

Hauptsächlich wird sich auf den Nachweis von einzelnen pathogenen Pilzorganismen (*Candida*, *Aspergillus*, Hefen und *Pneumocysts jiroveci*) konzentriert und nur wenige ermöglichen einen universellen Nachweis von Pilz-DNA in klinischen Untersuchungsmaterialien. Spezifische rt-PCR Tests zum Nachweis von primären Systemmykosen, kutan und subkutanen Mykosen liegen überwiegend in sogenannten In-House-Tests vor. Ebenso Testkits zur Identifizierung von Dermatophyten. [65]

Die Identifikation von Pilzorganismen mit klassischen Methoden ist anspruchsvoll, zeitaufwendig und verlangt einen hohen Grad an Erfahrung vom Untersucher. Trotz der Vereinfachung, Zeitersparnis und der hohen Sensitivität der molekularbiologischen Methoden ist derzeit kein Testverfahren allein in der Lage Pilzinfektionen (v. a. die invasiven Pilzinfektionen) festzustellen. Daher wird zur Diagnose die gemeinsame Beurteilung vom klinischen Bild, den konventionellen und molekularbiologischen Methoden genutzt. [63] Ziel soll es aber in Zukunft sein, diese konventionellen Methoden abzulösen, um vor allem eine Zeitersparnis zu erlangen, die vielen Patienten eine schnellere und gezieltere Behandlung ermöglicht.

In diesem Projekt soll der Fokus auf den Grundlagen der Entwicklung von molekularbiologischen Methoden liegen. Dabei spielt neben der Entscheidung für ein Nachweisverfahren zur genauen Identifikation einzelner Spezies auch die Wahl der Zielgenesequenz für die Spezifität der PCR eine Rolle. So zum Beispiel wird bei der Wahl von konservierten Genen zwar mit einer hohen Sensitivität, aber nur geringer Spezifität ein Erreger nachgewiesen. Anders bei variablen Abschnitten, dort tritt eine hohe Spezifität auf, aber eine geringe Sensitivität. [52] Ideal wäre eine Kombination aus beiden Bereichen für die Entwicklung effizienter und aussagekräftiger Nachweismethoden.

## 2.4 Zielgensequenzen

Die pilzlichen DNA liegt in der Zelle im Zellkern (haploid bis polyploid) vor. Sie ist dort in Chromosomen organisiert. Die Gene der Pilze auf den einzelnen Chromosomen sind in Introns und Exons unterteilt, wie bei allen Eukaryonten. Introns werden transkribiert, aber vor verlassen des Zellkerns zur Translation herausgespleißt, da sie keine relevante Information enthalten. Der in der mRNA verbleibende Teil wird als Exon bezeichnet und translatiert. [[45]/S. 695] Bei der Betrachtung einzelner Gene zur Identifikation von Pilzorganismen sind in erster Linie solche interessant, die als Multicopygene im Genom vorliegen und sowohl konservierte als auch variable Bereiche in der Sequenz besitzen. Anhand dieser Kriterien können verschiedene Gene betrachtet werden. Das am häufigsten in der Literatur beschrieben und auch praktisch genutzte ist das rRNA-Operon. Es beinhaltet neben den konservierten Genen auch variable „internal transcribed spacer“ (ITS) Regionen und kommt in mehreren tandemartigen Repeats im Genom vor. Aber auch andere Gene, die die beschriebenen Kriterien erfüllen, können von Interesse sein. So sind ebenfalls Cytochrom-Oxidase,  $\beta$ -Tubulin und Chitin- Synthase als Zielgene relevant. Sie werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

### 2.4.1 Cytochrom-Oxidase

Das Enzym Cytochrom-Oxidase (EC 1.9.3.1) ist eine Oxidoreduktase. Es ist auch unter den Bezeichnungen Cytochrom-c-Oxidase oder mitochondrialer Enzymkomplex IV bekannt. Bei Eukaryonten besteht dieser Enzymkomplex aus dreizehn Untereinheiten und ist in der inneren Mitochondrienmembran eingelagert. Dabei sind die Untereinheiten I–III mitochondrial und die weiteren Untereinheiten IV–XIII vom Nukleus kodiert. Dieser Komplex gehört zur Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen, welche bei allen lebenden und aerob atmenden Organismen vorkommt. Es stellt den terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette dar und ist somit für nahezu den sämtlichen Sauerstoffverbrauch der atmenden Organismen verantwortlich. [36]

Die Anwendung der Cytochrom-Oxidase hat den Vorteil, dass es bereits einige gut funktionierende Primer in der Untereinheit I gibt, die beispielsweise für die meisten Tierarten Sequenzdaten liefern. Ebenso vorteilhaft ist, dass die Cytochrom-Oxidase ein gutes phylogenetisches Signal zeigt, d. h. die Anzahl und die Verteilung der genetischen Unterschiede reichen aus, um zwischen der Mehrzahl der Arten zu unterscheiden. Anhand verschiedener Studien konnte die Verwendbarkeit der

Cytochrom-Oxidase gezeigt werden. [15] Sie verfügt aufgrund ihrer lebensnotwendigen Rolle im Metabolismus über stark konservierte Bereiche (Untereinheit 1). Ebenso besteht eine hohe Variabilität in der Aminosäure-Zusammensetzung. Wie in Abb. 4 zu sehen, besitzt das Molekül zwölf Transmembrandomänen (oben). Die höchste Variabilität zeigt sich am N-Terminus im 5'-Teil des Moleküls (unten), vor allem in den Transmembrandomänen M1, M3, und M4, sowie im Loop I2. [54]

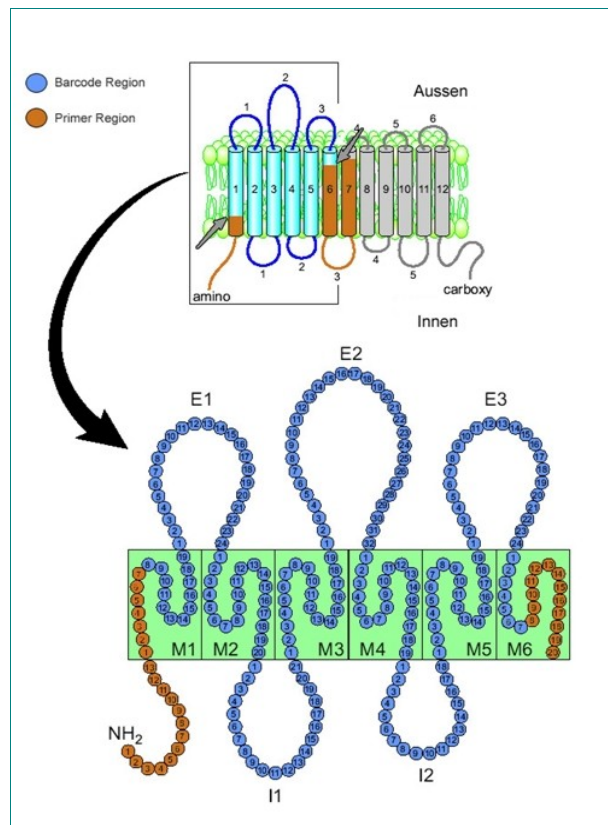


Abbildung 4: Cytochrom Oxidase [54]

Gezeigt wird hier ein Cytochrom-Oxidase Molekül bestehend aus 12 Transmembranen Domänen (oben). Der C- und N-Terminus befinden sich jeweils im Zellinneren. Im unteren Teil des Bildes ist ein Ausschnitt des Moleküls mit den einzelnen Basen gezeigt. Er umfasst die Domänen M1-M6 und die Loop außerhalb der Zelle 1-3 und innerhalb der Zelle 1-2.



### 2.4.2 $\beta$ -Tubuline

Tubuline sind die Grundbausteine von Mikrotubuli, die wichtige Strukturelemente der Zellen bilden. Im Wesentlichen bestehen Mikrotubuli in eukaryontischen Zellen aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tubulinen. Auch weitere Tubuline ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) sind bekannt, haben aber eine evolutionär beschränkte Verteilung. Tubuline haben vielfältige Aufgaben in der Zelle. Sie bilden zunächst ein Heterodimer im Cytoplasma, welcher durch Selbstassemblierungsprozesse Mikrotubulikomplexe bildet. Im Spindelapparat sind diese für die Verteilung der Chromosomen während der Meiose und Mitose verantwortlich und am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt. [44] Auch bilden ihre Strukturen die Basis für verschiedene Transportprozesse. Durch den röhrenförmigen Aufbau der Mikrotubuli, findet, wie in Abb. 5 gezeigt ist, der Transport von Vesikeln mit Neurotransmittern in Nervenzellen statt. [61]

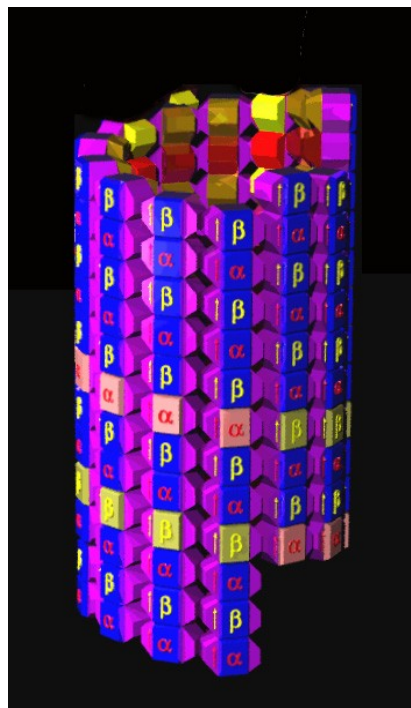


Abbildung 5: Anordnung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline eines Mikrotubuli [11]

Die Tubulingene können weit über das Genom verstreut oder in kleinen Gruppen zusammen liegen. [44] Besonders von Interesse sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline, da sie aufgrund ihrer zellulären Funktion, die am stärksten konservierte Bereiche von eukaryontischen Proteinen bilden. [38] Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Tubulin sind  $\beta$ -Tubulin-Gene sehr Intronreich und deswegen für phylogenetische Studien und Identifizierungsnachweise gut geeignet.

### 2.4.3 Chitin Synthase

Chitin Synthasen bilden eine Familie von integralen Membranproteinen, welche die Synthese von Chitin katalysieren. Es gibt sieben Klassen von Chitin Synthase Enzymen (EC 2.4.1.16) und sie sind neben Chitin Hauptbestandteile der pilzlichen Zellwand. [27] Es kommt ausschließlich in Organismen vor, die Chitin in ihrem Stoffwechsel besitzen. Zur Identifikation von pilzlichen Organismen ist dies bedeutend, da hier andere, nicht-Pilzorganismen als Reaktionspartner ausgeschlossen werden können. Es hat damit das Interesse von Forschern hervorgerufen. Allerdings ist es biochemisch noch schlecht erforscht. Die meisten Daten zur Chitin Synthase stammen aus genetischen Untersuchungen, wodurch viele Einträge in den Datenbanken hinterlegt sind. Die Gene der Chitin Synthase werden in fünf Klassen unterteilt, wobei ein Organismus Gene aus mehreren Klassen besitzen kann. Allen Genen der Chitin Synthasen ist jedoch gemeinsam, dass sie einen hydrophilen, variablen N-terminalen Bereich, einen neutralen mittleren und einen stark konservierten C-terminalen Bereich besitzen, da der C-Terminus Bedeutung hat für die Aktivität des Enzyms. Dort befindet sich sehr wahrscheinlich das katalytische Zentrum des Enzyms. [55]

### 2.4.4 rRNA Operon

#### rDNA Gene

Wie zuvor bereits beschrieben sind die Gene der rDNA die zurzeit am besten erforschten Gene. Dies hauptsächlich durch ihre Bedeutung für phylogenetische Studien zur Aufklärung der Stammesgeschichte und verwandtschaftlicher Beziehungen verschiedener Pilzorganismen. [17][18][21] Da RNA ein instabiles Molekül und deren Analyse technisch aufwendig ist, wurde in der Praxis fast immer mit den Genen der rRNA, also der rDNA gearbeitet. DNA ist wesentlich stabiler als RNA und einfacher zu handhaben. Von der rDNA wurde dann die Sequenz der rRNA abgeleitet. [44]

rRNA hat, genau wie tRNA, keine genetische Information codiert, welche in Proteine übersetzt werden, sondern wirkt als RNA Molekül aktiv in der Zelle. Zusammen mit ribosomalen Proteinen tragen sie zum Aufbau und zur enzymatischen Aktivität der Ribosomen bei. Ribosomen sind komplexe und lebensnotwendige Bestandteile aller lebenden Zelle unabhängig vom Organismus. Sie haben die Aufgabe der Proteinbiosynthese in der Zelle. Im Gegensatz zu Prokaryonten (70S) besitzen Eukaryonten 80S Ribosomen. In der Biologie werden die Massen sehr kleiner Teilchen in Form des

Sedimentationskoeffizient Svedberg (S) angegeben. [49] Ribosomen sind aus einer großen (LSU) und einer kleinen (SSU) Untereinheit aufgebaut. Bei Eukaryonten, wie auch bei Pilzen, besteht das Ribosom aus einer 40S kleinen Untereinheit und einer 60S großen Untereinheit (Tabelle 2). In der LSU werden neben ca. 50 ribosomalen Proteinen die Gene 5,8S, 28S und 5S prozessiert. Die SSU enthält dagegen ca. 33 ribosomale Proteine und die 18S rDNA. [44]

Zur Deckung des Bedarfs an Ribosomen im Zellstoffwechsel ist eine große Anzahl an rRNA erforderlich. So sind die Gene für 18S, 5.8S und 28S eng gekoppelt, äquimolar (im Verhältnis 1:1) und in mehreren tandemartigen Repeats im DNA Molekül angeordnet. Sie liegen also stark konserviert und in einer hohen Zahl im Genom vor. Abhängig vom Organismus können das mehrere 10 bis 1000 sein.

Ribosom	Untereinheit	rRNA	Nukleotide
80S	40S	18S (16S-19S)	ca. 2000
		ITS1	variabel
	60S	5,8S	160
		ITS2	variabel
		28S (25S-28S)	4000-5000
		5S	120

Tabelle 2: Zusammensetzung der Ribosomen in Eukaryonten

In einem Abschnitt liegen drei der vier rRNA Gene (18S, 5.8S, 28S) direkt hintereinander und werden gemeinsam durch die RNA-Polymerase I transkribiert. Sie bilden eine Genfamilie und Transkriptionseinheit.. Das vierte rRNA Gen, die 5S rDNA bildet eine eigene Genfamilie. Es wird durch die RNA-Polymerase III transkribiert und liegt abseits der eigentlichen Transkriptionseinheit im Genom, allerdings auch in tandemartigen Repeats. [44]

### ITS Regionen

Die konservierten 18S, 5.8S und 28S rRNA Gene werden auf DNA Ebene durch so genannte ITS-Regionen getrennt und von ETS Bereichen angeführt (vgl. Abb 6). Sie stellen Introns dar und werden zunächst transkribiert, aber dann aus der prä-mRNA herausgespleißt, bevor diese zur Translation aus dem Zellkern heraus geschleust wird. Zwischen den einzelnen Repeats der Transkriptionseinheiten liegen IGS Bereiche (intergenic spacer). Sie beinhalten die ETS-Bereiche (external transcribed spacer) mit Promotorstrukturen, in denen Polymerasen binden und die Transkription beginnt. Weitere Promotor- und Terminatorstrukturen befindet sich auch im IGS-Bereichen des Gens. Im Vergleich zu den rRNA Genen sind diese Bereiche im Gen hoch variabel. Sie wurden evolutionär nicht stark konserviert, da sie keine relevante Information für die Zelle enthalten.

Durch das Vorkommen dieser Region in allen lebenden Zellen, den zahlreichen Wiederholungen (Repeats) im Genom, der hohen Konservierung der Gene und der Variabilität der ITS Bereiche ist es ideal für phylogenetische Studien oder mögliche Identifizierungsverfahren geeignet. So kann man Identifizierungen bis auf die Artebene hinunter treffen. Zuletzt ist das rRNA-Molekül der am besten sequenzierte DNA Bereich bei Pilzen [32] und eine große Anzahl an Sequenz von einer Vielzahl von Organismen in Datenbanken hinterlegt.

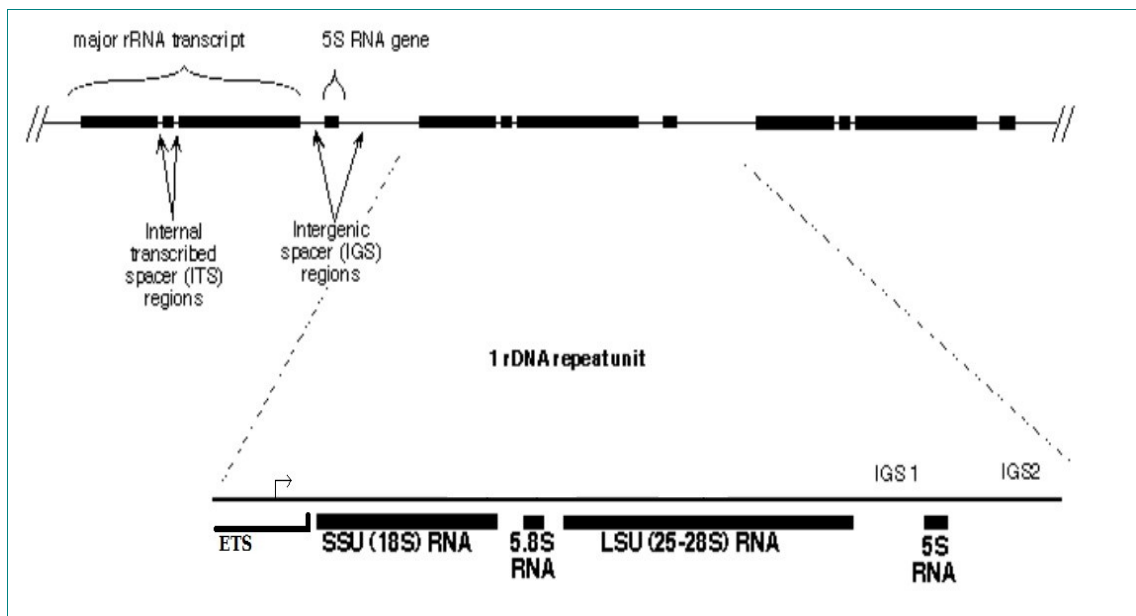


Abbildung 6: rRNA-Operon [68]

## 2.5 Ziel des Projektes

Das rRNA-Molekül verfügt über verschieden starke Konservierung, welche in diesem Projekt genutzt werden sollen. Es beinhaltet stark konservierte Bereiche (18S, 5.8S, 28S), die für die Funktion des Ribosoms entscheidend und daher in jedem Pilzorganismus unverändert sind. Mutationen, die hier auftreten, sind nur selten fixiert, da sie für den Organismus nachteilig und meist tödlich sind. Neben variablen Sequenzabschnitten, in denen Mutationen durch ribosomale Proteine kompensiert werden können, gibt es ebenso stark variable Bereiche (ITS1, ITS2). Mutationen in diesen Bereichen haben keine Auswirkung auf die Funktion des Ribosoms und unterliegen damit keinem starken Selektionsdruck wie etwa die Gene. Anhand dieser Bereiche sollte es möglich sein, zwischen einzelnen Pilzarten unterscheiden zu können.

Ziel dieser Arbeit war es nun einen Datenpool zu erstellen, der den größtmöglichen Bereich des rRNA Moleküls umfasst. Da in vergangenen Forschungsarbeiten oft nur Teilsequenzen analysiert und betrachtet wurden, sollte diese Arbeit Aufschluss darüber geben, ob es möglich ist, anhand der Kombination konservierter und variabler Bereiche eine Unterscheidung zwischen einzelnen Pilzarten zu treffen. Ist der Datenpool erstellt, sollten ebenso erste Anwendungsmöglichkeiten in Absprache mit der Firma Biotype betrachtet und erarbeitet werden. Beispielsweise der Nachweis spezifischer Candida - Arten und deren Ausschlussorganismen, auf Schleimhäuten des Menschen.

## 3 Erstellung des Datenpools

Zur Erfassung vieler medizinisch relevanter rRNA-Gene wurden 99 Pilzorganismen des DHS-Systems nach Rieth betrachtet. Darunter zählten 11 Dermatophyten, 14 Hefen und 74 Schimmelpilze. Der angestrebte Datenpool sollte neben den typischen Erregern, wie Aspergillen, Candida und Penicillien ebenso weniger übliche Erreger beinhalten. Zusätzlich werden Sequenzdaten von Ein- und Ausschlussorganismen betrachtet, die zur Entwicklung spezifischer Nachweisverfahren nützlich werden können.

### 3.1 Auswahl des Zielgens

In Absprache mit der Firma Biotype Diagnostic GmbH wurden verschiedene Pilzgene zur artspezifischen Identifikation in Betracht gezogen. Darunter zählten Cytochrom-Oxidase,  $\beta$ -Tubulin, Chitin Synthase und das rRNA-Operon. Zur Auswahl eines relevanten Zielgens wurden verschiedene Vor- und Nachteile der einzelnen Gene betrachtet. Neben den konservierten und variablen Bereichen innerhalb des Gens und den tandemartigen Repeats im Genom, war das entscheidende Kriterium die Datenlage der einzelnen Zielgene. Dazu wurde für jeden Organismus die entsprechenden Sequenzen in den Datenbanken gesucht und deren Datenlage tabellarisch festgehalten (Anlage: Teil 1). In Kombination mit den Datensätzen der Firma Biotype von selbst sequenzierten und bereits annotierten Sequenzen wurde die Auswahl eines relevanten Zielgenes getroffen.

### 3.2 Zielgenrecherche

Nach dem Festlegen auf ein Zielgen (rDNA) fand eine ausführliche Datenbankrecherche statt. Aktuell gibt es drei große DNA-Sequenzdatenbanken weltweit (Genbank/NCBI, EMBL/EBI, DDBJ). Sie werden täglich untereinander abgeglichen. In unserem Projekt wurde sich für die GenBank auf den Seiten des NCBI entschieden. Diese Datenbank enthält mehr als 189 Millionen Einträge mit zusammen über 299 Milliarden Basen von mehr als 380.000 Organismen (Stand Dezember 2010). [2] Die Suchanfrage wird durch das sog. Entrez-System ermöglicht. Es bietet die Möglichkeit einer Multidatenbanksuche. D. h., es wird nicht nur eine einzelne Datenbank

durchsucht, sondern alle, die auf den Seiten des NCBI verfügbar sind. Dazu gehören neben den Sequenzdatenbanken, auch Literaturdatenbanken, in denen medizinisches Fachwissen und wissenschaftliche Arbeiten hinterlegt sind, Protein- und Genomdatenbanken, taxonomische Daten sowie noch eine große Anzahl weiterer Datenbanken. Nach der Eingabe von Stichworten wird als Resultat eine Übersicht geöffnet. Diese zeigt einen Überblick über die Anzahl der Einträge in den einzelnen Datenbanken. In unserem Projekt hatten neben den Sequenzdaten (Nukleotiden) auch die genomischen Daten der Organismen eine Bedeutung. Diese wurden später benötigt, um potentielle Primersequenzen auf ihre Nutzbarkeit zu prüfen.

Zu Beginn wurden wir die Einträge der Sequenzdaten des Zielgens unserer Organismen genutzt. In der Nucleotiddatenbank des NCBI sind keine vollständigen rDNA Sequenzen hinterlegt sondern nur partielle Sequenzabschnitte. Diese umfassen den Bereich von einigen 100 bp der 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 und wiederum einige 100 bp der 28S rDNA, sowie Einträge zu 18S und 28S rDNA. Die Anzahl der Einträge variiert je nach Forschungsstand und Problemen bei der Analyse zwischen keinem und mehreren hundert. Um bei mehreren Einträgen eine aussagekräftige Sequenz zu erlangen und das Problem der Redundanz zu lösen wurden die einzelnen Sequenzdaten der Datenbankeinträge in einem Multisequenzalignment aligniert. (ClustalW 2.0 [P2]) Im Ergebnis wurde eine Konsensussequenz berechnet, mit der im weiteren Verlauf des Projektes gearbeitet wurde.

Zum Aufbau von Nachweisverfahren zur Identifizierung von Pilzspezies sollten möglichst große rRNA-Sequenzen betrachtet werden. Da aber nur ein Teile der gesuchten Sequenz in der Datenbank des NCBI hinterlegt ist, wurde auf eine weitere Datenbank zugegriffen: die ArbSilva Datenbank. ([P7]) In dieser Datenbank sind Sequenzdaten der ribosomalen Untereinheiten von einer großen Anzahl an Organismen hinterlegt. Dabei werden neben der Sequenzlänge auch bereits die Sequenz- und die Alignmentqualität angegeben. Damit hat der Nutzer die Möglichkeit die qualitativ beste Sequenz zu nutzen. Die Einträge der ArbSilva verweisen auf die Seiten des EMBL und des NCBI, in deren Datenbanken die Sequenzen hinterlegt sind.

### 3.3 Assemblieren der recherchierten Sequenzdaten

Nach der Recherche der Zielensequenzen (Nukleotidabfolge) zu jedem Pilzorganismus werden die Daten manuell assembliert. Das bedeutet im Einzelnen, dass die große und die kleine Untereinheit mit einer Überlappung von ca. 30 Basenpaaren mit der ITS Konsensussequenz verbunden werden. Diese Daten werden für die spätere Verarbeitung in Textfiles abgelegt und gespeichert. Nach dem Assemblieren der rDNA-Region werden zusätzlich die recherchierten Daten mit dem Sequenzierergebnis der Firma Biotype verglichen, um die Qualität der Daten zu überprüfen. Auch die Ergebnisse eines weiteren Teilprojektes der Firma Biotype, welches sich mit den Qualitätskriterien der selben sequenzierten und annotierten Daten befasst, wurden mit einbezogen. Ebenso die Ergebnisse des Web-Anwendung EMERENCIA [34], die sich mit ungenügend identifizierten Sequenzen NCBI Einträgen beschäftigt. So dass im Ergebnis die größtmöglichen rDNA-Sequenzen für die einzelnen Pilzorganismen entstanden sind.

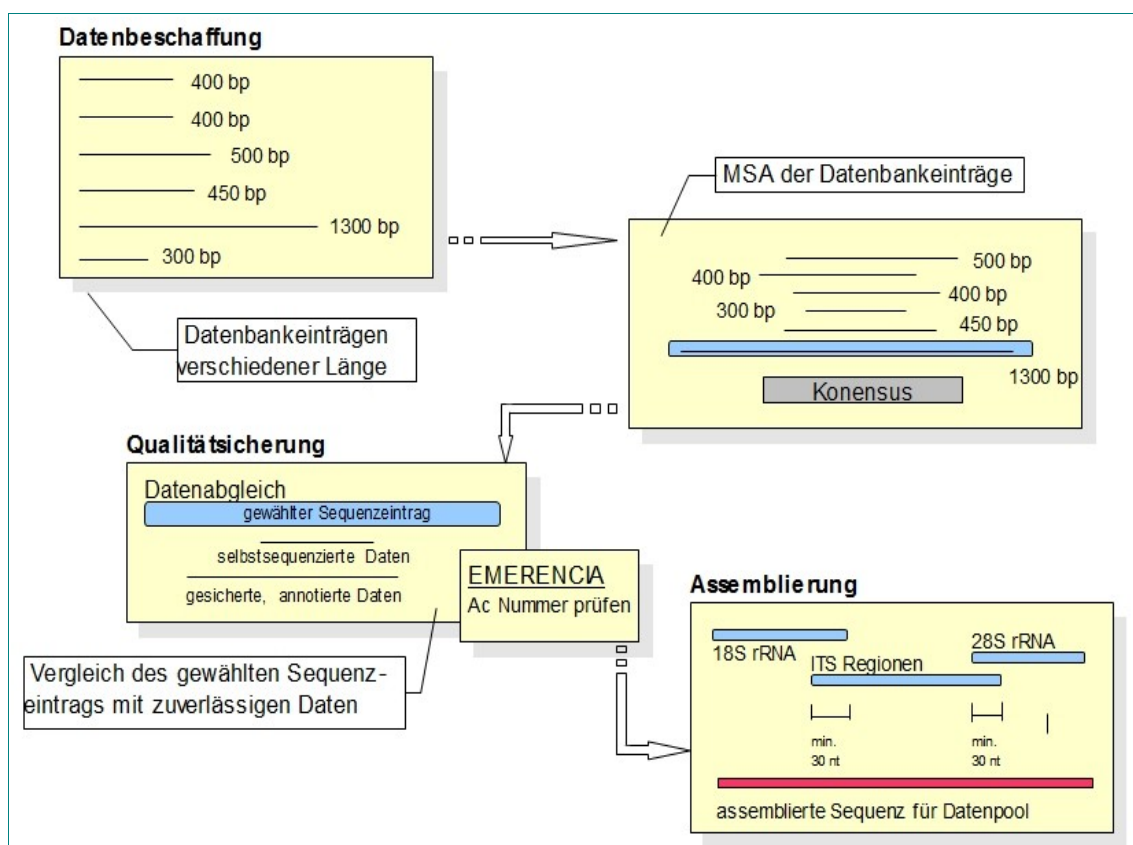


Abbildung 7: Schema zur Auswahl und Assemblierung der Sequenzdaten



### 3.4 Verarbeitung der Daten

Die assemblierten Daten wurden vor der Weiterverarbeitung annotiert. Im Einzelnen hieß das, dass einzelne Sequenzabschnitte als rRNA Gene und die trennenden Bereiche als ITS1 oder 2 identifiziert und markiert werden (18S, 5.8S, 28S). Es wurden einerseits Annotationen der NCBI Einträge übernommen und andererseits markante Sequenzabschnitte zu Grunde gelegt (3' Ende der 18S rRNA: ... ATCATTA). Mit diesen aufgearbeiteten Sequenzen konnten nun erste Ansätze für neue Nachweisverfahren erarbeitet werden. Grundlegend für die Entwicklung neuer Ansätze für Nachweisverfahren war Multisequenzalignemnet (MSA). Dies wurde durch zwei verschiedene Tools – ClustalW (2.0) [P2] und CLC Workbench [P1] - realisiert, die auf der Basis des selben Algorithmus arbeiten. Im Ergebnis berechnen beide Programme ein MSA anhand von paarweisen Alignments entlang eines phylogenetischen Baumes, der die Distanz zwischen den zu alignierenden Sequenzen widerspiegelt. Ziel ist es so, möglichst homologe Sequenzen zuerst zu alignieren. Der Algorithmus berechnet den besten Match für die ausgewählten Sequenzen und stellt sie so zusammen, dass die Identität, die Ähnlichkeit und die Unterschiede übersichtlich dargestellt sind. Ebenso boten die Programme die Möglichkeit evolutionäre Zusammenhänge in Form von Cladogrammen und Phylogrammen zu betrachten. Die Basisinformation, die MSA zur Verfügung stellen, ist die Identifizierung von konservierten Bereichen auf der Sequenz. [58]

Der Algorithmus arbeitet im Wesentlichen in drei Schritten, um aus den Eingabesequenzen ein MSA zu generieren:

1. **Paarweises Alignment:** Es erfolgt eine Berechnung der einzelnen Scores durch dynamische Programmierung mit Gap-Penalties und Substitutionsmatrix. Die erhaltenen Scores werden in Distanzen konvertiert. Mit diesen Distanzen wird eine Matrix gefüllt, in der alle Sequenzen gegeneinander aufgetragen werden. Es entsteht eine Distanzmatrix.
2. **Guide Tree:** Erzeugung eines Guide Trees mittels Neighbour-Joining oder dem neu implementierten UPGMA Algorithmus [25] aus der zuvor entstandenen Distanzmatrix. Hierdurch erhält man einen Baum mit einer Astlänge, die zur Divergenz der Sequenzen proportional ist. Dabei hat der Guide Tree den Zweck, Sequenzen entsprechend ihrer Übereinstimmung so anzuordnen, dass sie bei einer Abarbeitung entlang dieses Baumes jeweils möglichst homologe Sequenzen miteinander aligniert werden.

3. **Progressive Alinierung:** In diesem Schritt wird entlang des Guide Trees in Richtung der Wurzel das Alignment durchgeführt. Es werden jeweils zwei Sequenzen oder Sequenzgruppen durch dynamische Programmierung aligniert.

Durch die Auswahl verschiedener Parameter (Substitutionsmatrizen, Gaps usw.) konnte die Suche spezifiziert und damit das Ergebnis beeinflusst werden. Für unsere Arbeit reichten die Standardeinstellungen des Programms aus. Diese beinhalteten für das paarweise Alignment: Gap-Kosten für das Öffnen von 10 und das Erweitern von 0,1 und die Anwendung einer BLOSUM Gewichtungsmatrix. Für das MSA wurde ebenso die BLOSUM Matrix verwendet. Die Gap-Kosten bestanden für das Öffnen aus 10 und für das Erweitern aus 0,2 und einem Abstand von 5. Ebenso konnten Lücken an den Enden des Alignments eingefügt werden. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte in beiden Programmen als eine Übersicht. Neben einer flexiblen Wahl des Eingabeformats war es bei ClusatlW ebenso möglich verschiedene Ausgabeformate, wie Philip, Nexus oder Fasta, zu wählen. Diese ermöglichen ein weiteres Arbeiten mit den Daten des MSA.

### 3.5 Erstellen phylogenetischer Bäume

Aus dem MSA konnte im folgenden ein phylogenetischer Baum erstellt werden. Dies geschah durch das Programmpaket PHYLIP (**PHY**Logeny Inference **P**ackage). Es wurde 1980 von Joseph Felsenstein [59] entwickelt und ist über das Internet frei verfügbar. Ebenso ist der Quellcode (in C) frei zugänglich. Am Institut Pasteur in Paris gibt es einen frei zugänglichen Web-Server für PHYLIP [P3]. Verfügbare Methoden sind kladistischen Verfahren (Parsimony-Ansätze), Distanzmatrizen, likelihood Analysen, Assemblierungsmethoden, Alignierungsverfahren und phylogentische Berechnungen. PHYLIP ist das am weit verbreitete Phylogenie Paket und wird regelmäßig aktualisiert. [59]

Auf der Startseite des Web-Servers ist im linken Teil eine Übersicht über verschiedene Anwendungen sichtbar. Unter dem Register Programm – phylogeny – distance findet sich das Programm >dnadist< Anhand dessen wird aus unserem MSA (vgl. Kapitel 3.4) eine Distanzmatrix berechnet. Das Programm benötigt als Eingabe das MSA in Form

einer phylip-Ausgabe, was sich problemlos bei der Berechnung des MSA über ClustalW einstellen lässt. Ebenso werden zur Berechnung der Matrix die Standardeinstellungen, die das Programm vorgibt, genutzt. Das Ergebnis ist die berechnete Matrix (outfile), die direkt als Eingabe (infile) für weitere Berechnungen genutzt werden kann. Aus dieser Matrix wird in einem nächsten Schritt ein phylogenetischer Baum erzeugt. Es wird ein gewurzelter, binärer Baum nach der Neighbour-Joining-Methode berechnet. Diese Methode wird bei der Berechnung bevorzugt, da sie neben der Suche nach minimalen Abständen auch nach Gruppe von Nachbarn sucht. Im Gegensatz zur UPGMA, bei der die Zweige mit minimalen, absoluten Abstände voneinander unmittelbare Nachbarn im Baum bilden. Dies kann falsche Topologien im Baum erzeugen. Die Neighbour-Joining-Methode ist daher die präzisere und die am häufigsten genutzte Methode, da sie die Schwäche der UPGMA ausbessert. Des Weiteren können mit dieser Methode Bäume für geringen evolutionäre Distanzen (nah verwandte Arten) berechnet werden, wie es in diesem Projekt der Fall ist. Allerdings ist zu bedenken, dass außerhalb der Zielgensequenz die quantitativen Aussagen nicht mehr gültig sind.

Das Resultat der Berechnung sind zwei Dateien:

- Textfile (.outfile): enthält den berechneten Baum, in dem erkennbar ist, in welcher Reihenfolge einzelne Sequenzen eingefügt wurden
- Tree (.outtree): enthält Daten des Baumes in Klammernotation, dieser kann über eine weitere Programmkomponente, Archaeopteryx 0.955 beta (Phylogenetic Tree Viewer), graphisch dargestellt und ausgewertet werden.

## 4 Ergebnisse

Zur Entstehung des Datenpools wurden viele einzelne Punkte betrachtet. Dazu gehörte neben der Wahl des Zielgens auch die Auswahl qualitativ hochwertiger Sequenzen und deren Assemblierung. Im Ergebnis war ein Datenpool entstanden, der Sequenzdaten von insgesamt 76 Organismen umfasst. Zusätzlich wurden 9 Ein- und Ausschluss Organismen betrachtet, die als häufige Begleitflora auftreten. Dazu gehörten neben dem Menschen selbst, typische Haus- und Nutztieren wie Rind, Pferd, Hund, Katze, Maus und Ratte. Mit den ermittelten Sequenzen konnten ,auf Grundlage von MSA und phylogenetischen Bäumen, erste Anwendungsbezogene Nachweise gezeigt werden. Die Sequenzen von 23 Organismen konnte nicht bzw. nicht vollständig ermittelt werden und wurden dabei nicht mit betrachtet.

### 4.1 rRNA als Zielgen

Nach ausführlichen Betrachtungen aller Zielgene fiel die Wahl auf das rRNA-Operon. Allen Zielgenen war ihre lebenswichtige Rolle im Stoffwechsel des Organismus sowie die konservierten und variablen Bereich innerhalb des Genes gemeinsam. Aufgrund des häufigen Vorkommens von Sequenzdaten des rRNA-Operons in den Datenbanken und den zahlreichen wissenschaftlichen Studien und Arbeiten, die als Wissensgrundlage dienten [4][18][21][22][30], wurde auch in dieser Arbeit das rRNA-Operon als Zielgen ausgewählt. In der folgenden Graphik (Abb. 8) ist das Vorkommen aller Zielgensequenzen in den Datenbanken des NCBI und des EMBL, bezüglich der ausgewählten Organismen des Datenpool, dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das rRNA-Operon mit ca. 76% das Zielgen mit den meisten Einträgen in den Datenbanken darstellt. Alle anderen Zielgensequenzen waren in geringerer Zahl vertreten.

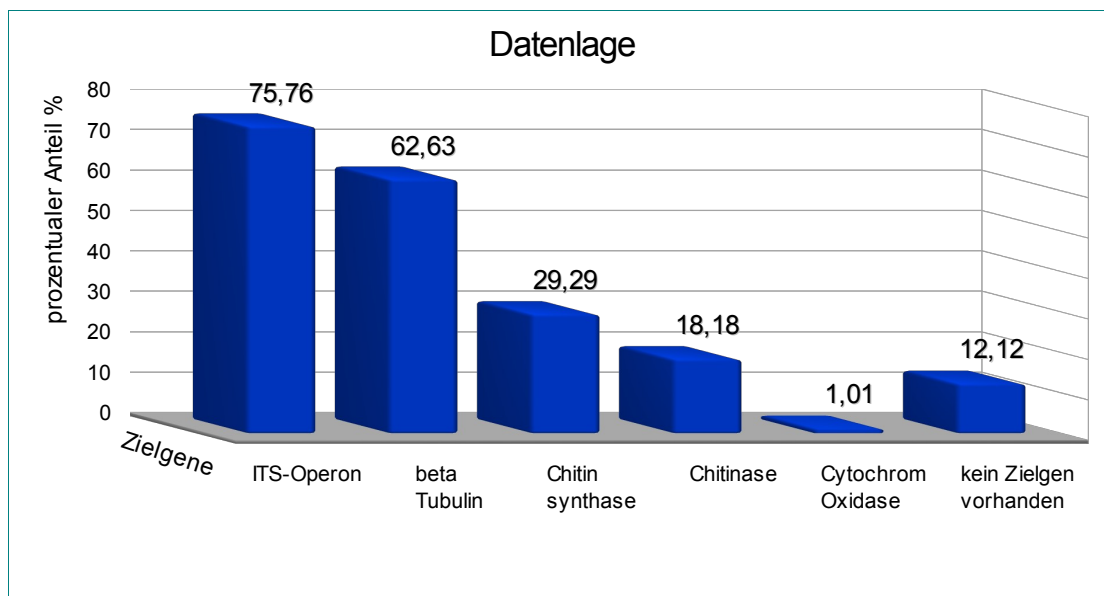


Abbildung 8: graphische Übersicht zum Vorkommen von Sequenzen aller Zielgenen in Datenbanken

## 4.2 Alignierung und Assemblierung der Sequenzdaten

Bei der Suche nach den einzelnen Zielgenbereichen des rRNA-Operons wurden teilweise mehrere hundert Treffer, für einen Organismus, angezeigt. Um eine Sequenz zu erhalten, deren Qualität gesichert ist, wurde mit den verschiedenen Einträgen, mittels ClustalW, ein MSA gemacht. Dabei war darauf zu achten, dass bereits redundante Daten nicht in das Alignment mit einbezogen wurden. Diese waren anhand fortlaufender Accession Numbers leicht zu erkennen.

In Abb. 9 ist solch ein MSA in einem Ausschnitt dargestellt. Es wurde berechnet auf Grundlage von den vier größten Einträgen, bezogen auf die Anzahl der Basenpaare, von *Penicillium griseoflavum* aus der GenBank Datenbank. Erst einmal sind unterschiedliche Zugangsnummern zu erkennen, die redundante Daten ausschließen. Es ist zu sehen, dass die Sequenzen fast identisch sind, obwohl sie aus verschiedenen Jahren und Sequenzierprojekten stammen. Einzige Ausnahme bildet der Eintrag mit der Nummer gb|GQ305305. Er unterscheidet sich in mehreren Positionen innerhalb der Sequenz (rote Quadrate) von den anderen. Da sich dieser Unterschied in keiner anderen der drei Sequenzen zeigte, wurde dieser Eintrag als qualitativ nicht so hoch eingeschätzt und für das weitere Arbeiten nicht genutzt. In diesem Beispiel wird mit der Sequenz gb|DQ339553 weitergearbeitet, da sie sowohl mit den anderen übereinstimmt als auch die größte Anzahl an Basenpaaren aufwies.

Abbildung 9: MSA der Einträge von *Penicillium griseoflavum*

Nach der Recherche aller Bereiche der ausgesuchten Organismen (99) lagen für 76 Organismen sowohl die 18S rDNA, die 28S rDNA als auch der ITS Bereich (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) vor. Für 24 Organismen, sowohl Dermatophyten, Hefen als auch Schimmelpilze, konnte ein Teil des rRNA-Operons nicht ermittelt werden, da entsprechende Daten nicht in der Datenbank hinterlegt waren (vgl. Anlage 2).

Die vorliegenden Konsensussequenzen der einzelnen rRNA Bereiche wurden in einem nächsten Schritt manuell assembliert. Dazu wurden die Konsensussequenzen des entsprechenden Organismus in einem Textfile hinterlegt und Überlappungsbereiche in der Sequenz gesucht. In Abb. 10 ist dies beispielhaft dargestellt. Es sind neben der Bezeichnung des rDNA Abschnittes die verschiedenen Accession Numbers (NCBI) gezeigt. In den blauen Regionen sind die Überlappungsbereiche der einzelnen Sequenzabschnitte dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine große Anzahl von Nukleotiden identisch sind. Im Bereich der 18S rDNA mit der ITS Region sind es 273 Nukleotide und im Bereich der 28S mit der ITS Region sind es 527 Nukleotide. Analog wurde dies auf alle anderen Konsensussequenzen angewendet, wobei ein Überlappungsbereich von 30 Nukleotiden nicht unterschritten wurde.



```

Penicillium griseofulvum
18S rDNA: EF607282
TCCAACTTGGTTGATCCTG CCAAGTATCATAT GCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAGTATAAGCAACTTGTACTGTGAAACTGCG
AATGGCTCATTAATCACTATCGTTTATTTGATAGTACCTTA CTACATGGATACCT GTGGTAATCTA GAGCTAATACAT GCTAAAAACCCG
GACTTCAGGAAGGGGTGATTATTTAGATATAAAACCAACGCCCTT CGGGGGCTCCTT GGTGAATCATAA TAACTTAACGAA TCGCATGGCCTT
GCGCCGGCGATGGTTCAIT CAAATTTCTGCCCTATCAACTTTC GATGGTAGGATAGT GGCCTACCATGGTGGCAACGGGTAACGGGGGAATTAG
GGTTCCGATTTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGCGTACCACATC CAAGGAAGGCAGCA GGCAGCGCAAAT ACCCAATCCCGA TACGGGGAGGTA
GTGACAA TAAATACTGATA CGGGGCTCTTTTGGGTCTCGTAAT TGGAAATGAGAACAA TTTAAATCCCTT AACGAGGAACAA TGGAGGGCAAG
TCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTC CAATAGCGTAT ATTAAGTTGTGTCAGTTAAAAAGCT CGTAGTTGAACCTTTGGGCTGGCT
GGCCGGT CCGCCTCACC GCAGTACTGGTCCGCTTGGGCTTT CTTCTGGGGAACTCATGGCCTTCA CTGGCTGTGGGGGGAACGAGGACT
TTTACTGTGAAAAATCAGAGTGT CAAAGCA GGCCTTTGCTC GAATACATTAGCAT GGAATAATAGAA TAGGACGTGTGGTTCTATTTGTG
GTTTCTAGGACCCCGTAA TGATTAATAGGGA TAGTCGGGGGCTCAGTATTAGCT GTGAGAGGTGAAATCTTGGATT GCTGAAGACTAA
CTACTGCGAAAGCATTGCGC CAAGGATGTTTTCAATTAATCAGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGAT CAGATACCGCTGATGCTTAAACCA
TAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGGATT CTATAATGACC CGTTCGGCACCTTA CGAGAAATCAAAGTTT TGGGTTCTGGGGGGAGTAT
GGTCGCAAGGCTGAAACTT AAAGAAATGACG GAAGGGCACC CAAGGCGTGGAGCTTCCGGCTTAATT TGACTCAACACG GGGAAACTCACC
AGGTCCA GACAAAATAAGGATTGACAGATTGA GAGCTCTTCT TGATCTTTTGGATG GTGGTGATGGC CGTCTTAGTTG GTGGAGTGAATT
GTCTGCTTAAITGCGATAA CGAACGAGACCTC GGCCTTTAAAT AGCCCGGTCCGCTAT TTGCGGGCCGCT GGCTTCTTAAGG GGAATCAGCT
CAAGCCGATGGAAATGCGC GGCATAACAGGT CTGTGATGCCCTTTAGATGTTCTGGG CCGCACGCGCTACACTGACAGGG GTCAGCGATAC
ATCACTTAAACCGAGAGGT TTGGGTAATCTTTGTTAAACCTGT CTGTCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAA CGAGGAATGCCT
ATGAGGCACGAGTCATCAG CTCGTGCCGATTA CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGC CCGTCGCTACTA CCGATTGAATGG CTCAGTGAGGCC
TTGGGATTGGCTTAGGAGG GTGGCAACGACCC CCGAGAGCGG AAAACTTGGTCAAA CTCGGTCAATTA GAGGGAAG

ITS-Regionen: DQ339553
CCAGCGAGTACATCACTTAAACGAGAGGTTT GGGTAATCTTGTTAAACCTGTCTGT GCTGGGGATAGA GCATTGCAATTA TTGCTCTTCAAC
GAGGAAT GCCTAGTAGGCA CGAGTCATCAGCT CGTGGCGATTA CGTCCCTGCCCTTT GTACACACCGCC CGTGGCTACTAC CGATTGAATGGC
TCAGTGA GGCCTTGGGATT GGCCTTAGGAGGGT TGGCAACGACC CCGCAGAGCCGAAA ACTTGGTCAAAC TCGGTCAATTTAGAGGAAGTAAAAG
TCGTAAACAAAGGTTTCCGTA GGTGAACCTGCGGAAGGATCATT A CTGAGTGAGGGGCCCTCTGGGTCCAAC CTCACACCCGTGTTTATTTACCTT
GTTGCTT CCGCGGGCCCGCCTTAAC TGGCCGC CGGGGGGCTTAC GCCCCCGGGCCCG CGCCCGCCGAA GACACCTCGAACT CTGTCTGAAGA
TTGTAGTCTGAGTGAAATATAAATTAATTTAAACCTTCAACAA CGGATCTCTTGGT TCCGGCATCGA TGAAGAACGACGCGAAATGCGGATAC
GTAATGT GAATGCAAAAT CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC GCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGGGGGCATGCTGTCTCCGAGCGTCAT
TGCTGCTCTCAAGCAGCGCTTGTGTGTGGGCCCCGTCTCCGATTTCCGGGGGACG GGCAGGAAAGGCA GCGGCGGACCGC GTCCGCTCTC
GAGCGTA TGGGGCTTTGTCAACCGCTCTGTAG GCGCGCGCGGCTTGGCGATCAAC CCAAATTTTAT CCAGGTTGACCT CGGATCAGGTAG
GGATACCGCTGAACCTTAA GCATATCAATAAG CGGAGGAAAGAAACCAACAGGGAT TGCCCCAGTAAC GCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCA
AAATTTGAAGCTGGCTCCT TCGGGGTCCGCTAT TGTAATTTGTA GAGGATGCTTCCGGAGCGGTCCCAT CTAAGTGCCCTGGAACGGGACGTC
ATAGAGG GTGAGAATCCCGTATGGGATGGGGT GTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTT CACGAGTCGAGT TGTTTGGGAATG CAGCTCTAAATG
GGTGGTAAATTT CATCTAA AGCTAAATATTGG CCGGAGACCGA TAGCGCACAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAGCACT TTGAAAAGAGAG
TTAAAAAGCAGCTGAAATTT GTTGAAGGGAAG CGCTTGCGACC AGACTCGCTCGCGGGTT CAGCCGGCATTCGTGCCGT GTACTTCCCCGC
GGGCGGGCCAGCGCTCGTT TGGCGGTCTGCTCAAAGGCCCTCG GAAAGTAAACGCCCC TAGGGGCTCTT ATAGCCGAGGGT GCAATGCGACCT
GCCTAGA CCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCATAAT GGTG

```

Abbildung 10: Beispielassemblierung anhand *Penicillium griseofulvum*

Im Ergebnis entstand ein Datenpool mit nahezu vollständigen rDNA Sequenzen für 76 Organismen, welcher die wichtigsten pilzlichen Krankheitserreger und ebenso weniger häufige, aber dennoch medizinisch relevante Pilze, erfasst.

Anhand dieses Sequenzdatenpools konnten nun verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden. Zunächst wurde ein MSA aller rRNA Sequenzen der Organismen erstellt, das konservierte und variable Bereich aufzeigt und Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede zwischen den Organismen darstellen sollte.

### 4.3 Auswertung der Sequenzalignments

Zur Erstellung der MSA wurde das Programm CLC Workbench (Version 6.1) genutzt. Dieses Programm wurde bevorzugt, da es eine bessere optische und übersichtliche Aufarbeitung der Ergebnisse lieferte. Im Ergebnis erhielt man eine Übersicht über die Berechnungen des Programms zum MSA in detaillierter oder allgemeiner Form. In Abb. 11 wird ein allgemeiner Überblick von dem Vergleich der rRNA Sequenzen von 76 Organismen gezeigt. Darin sind zunächst am rechten Rand alle Organismen in verkürzter Schreibweise aufgelistet. Daneben sind die stark vereinfachten Sequenzen dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Sequenzlänge zwischen den Organismen stark variieren. Vor allem in den Bereichen der 28S rDNA treten starke Verkürzungen auf, da hier nur kurze Daten in der Datenbank hinterlegt sind. Außerdem ist eine graphische Darstellung der Konservierung im unteren Bereich zu sehen. Bei der Betrachtung des detaillierten MSA ( beigefügte CD) sind die einzelnen Basen in ihrer Abfolge dargestellt. Sie sind farblich unterlegt. Ebenso wird auch hier eine Konsensussequenz für das weitere Arbeiten und eine graphische Aufarbeitung der Konservierung gezeigt.

Wie bereits erwartet traten in den 18S, 5.8S und 28S stark konservierte Bereiche auf, wobei die Konservierung im 18S Bereich deutlicher erkennbarer ist als im 28S Bereich. Dies ist sowohl in der allgemeinen als auch in der detaillierten Ausgabe erkennbar. Für die Entwicklung von Identifikationsmethoden und dem damit verbundenen entwerfen von markanter Primern sollen vor allem die konservierten Bereiche der 18S rDNA eine Rolle spielen, daher wurden die Sequenzen im Alignment im 28S Bereich verkürzt und der Fokus auf die 18S rDNA gelegt.

Ebenso gut erkennbar sind die variablen Bereiche der ITS Regionen, in denen sich jeder einzelne Pilzorganismus vom anderen unterscheidet. Auch hier sind verschiedene Längen der ITS1 und ITS2 Bereiche auf der Sequenz zu beobachten. Im Gegensatz zu den Genen hängt dies aber nicht mit der Verfügbarkeit in den Datenbanken zusammen, sondern ist durch die Variabilität der einzelnen Organismen begründet.



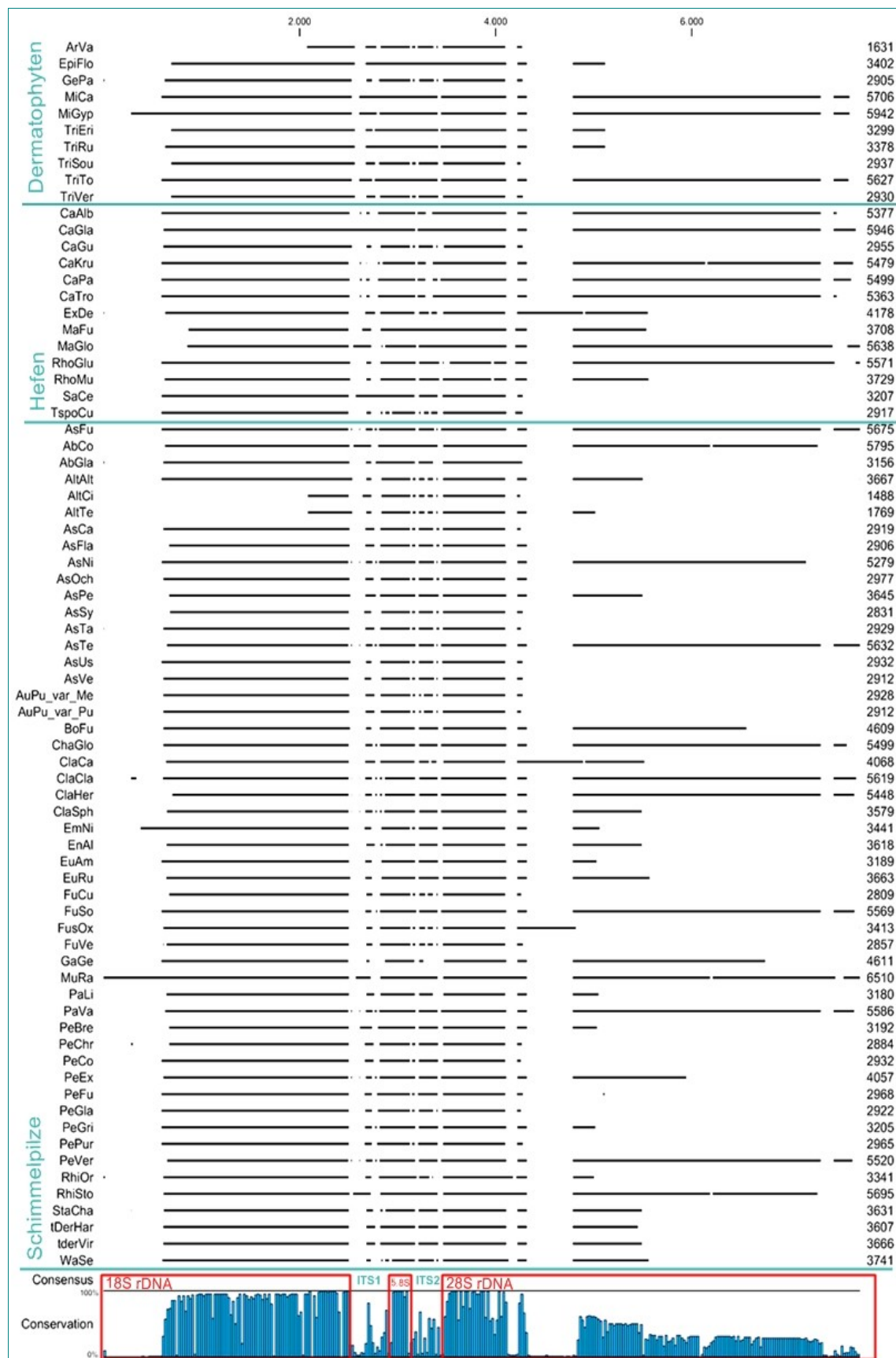


Abbildung 11: Überblick des MSA aller Organismen des Datenpools

## 4.4 Interpretation und Anwendung auf verschiedene Fragestellungen

### Betrachtung phylogenetischer Bäume

Bezug nehmend auf eine erste Anwendungsmöglichkeit (Chiptechnologie) wurde das MSA aller Organismen in einen phylogenetischen Baum umgerechnet, um mit diesem, bezogen auf die Zielensequenz, verwandtschaftliche Verhältnisse darzustellen.

Dieser Gedanke basiert auf einem molekularbiologischen Verfahren, bei dem nach der Amplifikation des rRNA-Operons spezifische Sonden generiert werden. Diese hybridisieren auf einem sogenannten Chip und sind entscheidend für den artspezifischen Nachweis der Pilzorganismen. [60] Zunächst sucht man in den konservierten Bereichen der 18S und 28S solche Bereiche, die in möglichst vielen Organismen identisch sind. In einem Alignment mit 76 Organismen bereitet dies einige Schwierigkeiten, so dass man phylogentische Bäume zu Hilfe nimmt. Dort können anhand der Äste und Zweige des Baumes verschiedene Organismen in Gruppen zusammen gefasst werden. Diese Gruppen werden erneut in einem MSA berechnet und sukzessive um weitere Sequenzen entlang der einzelnen Verzweigungen des Baumes erweitert. Dies soll in einem späteren Analyseverfahren die Amplifikation des rRNA Bereichs möglichst vieler Pilzorganismen gleichzeitig, mit nur wenigen Primern ermöglichen. Anhand der variablen Bereiche werden dann, die zuvor beschriebenen Sonden, generiert, um die Organismen eindeutig zu identifizieren. In Abb. 12 ist der Ausgangsbaum mit einer mögliche Zusammenfassung der Organismen in 5 Gruppen aufgezeigt. Es ist ein gewurzelter Baum mit Hilfe der Neighbour-Joining-Methode berechnet wurde. Jede Organismengruppe ist farblich anders markiert und sie sollen nun in einem nächsten Schritt mit anderen Gruppen zusammengefasst und damit erweitert werden.

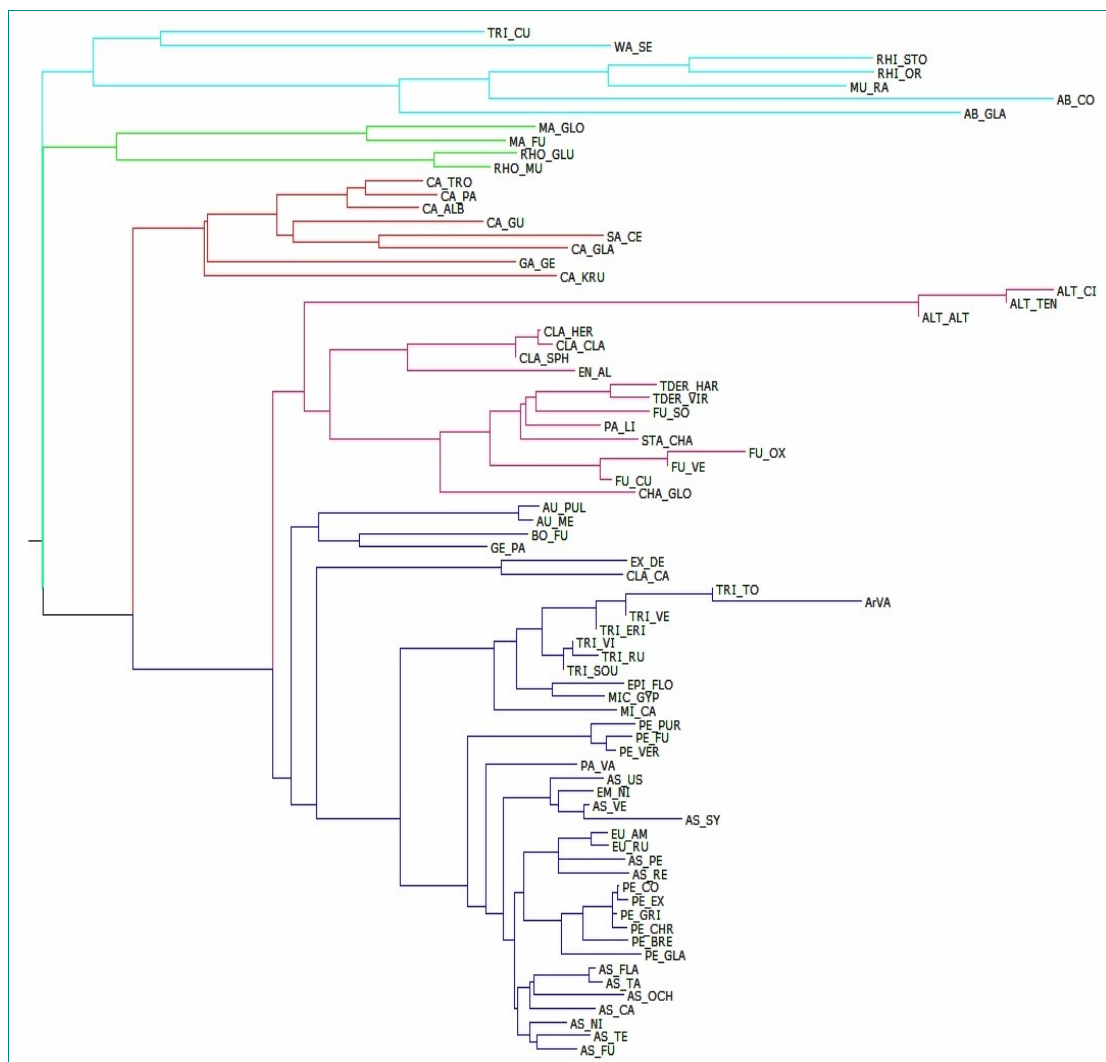


Abbildung 12: Ausgangsbaum mit verschieden farbig eingeteilten Organismengruppen

Ausgangspunkt ist die dunkelblau markierte Gruppe. Im MSA aller Organismen dieser Gruppe sind Bereiche in den konservierten Regionen (18S, 28S) erkennbar, anhand derer Primer generiert werden könnten (vgl. Abb. 13 und 14). In diesen Bereichen sind die Sequenzen der einzelnen Organismen nahezu identisch.

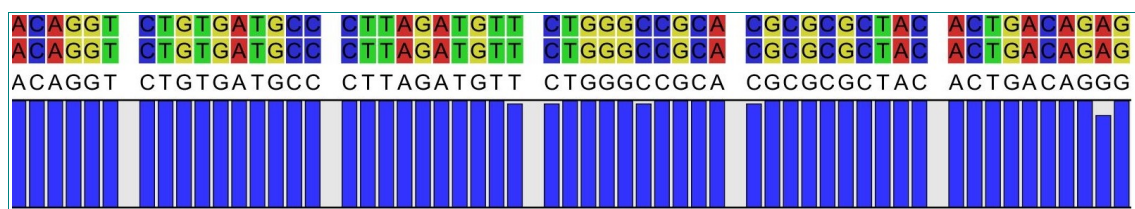


Abbildung 13: Ausschnitt aus 18S Bereich des MSA mit stark konservierten Bereich der dunkelblauen Gruppe

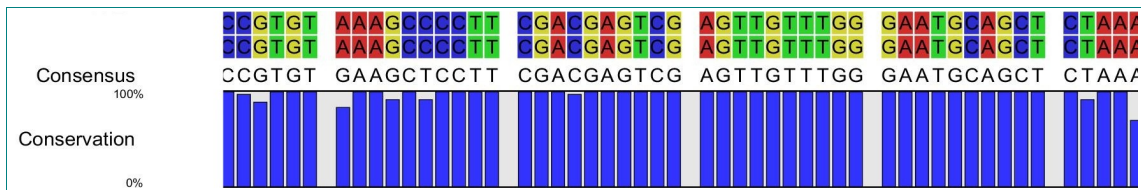


Abbildung 14: Ausschnitt aus 28S Bereich des MSA mit stark konservierten Bereich der dunkelblauen Gruppe

In einem zweiten MSA, das neben der dunkelblauen Gruppe auch die rosa Gruppe umfasst, sind solche Bereiche ebenfalls erkennbar.

Nun wurde auch noch die dritte Gruppe (rot) in das MSA mit eingeschlossen. Auch hier treten in den konservierten 18S rDNA Bereichen Abschnitte auf, die ein Primerdesign zulassen. Da es bei der Generierung von Primer möglich ist universelle Basen einzufügen (Y, R, W), die unterschiedliche Nukleotide in der Targetsequenz erlauben, lassen sich auch hier im 28S Bereiche Abschnitte finden.

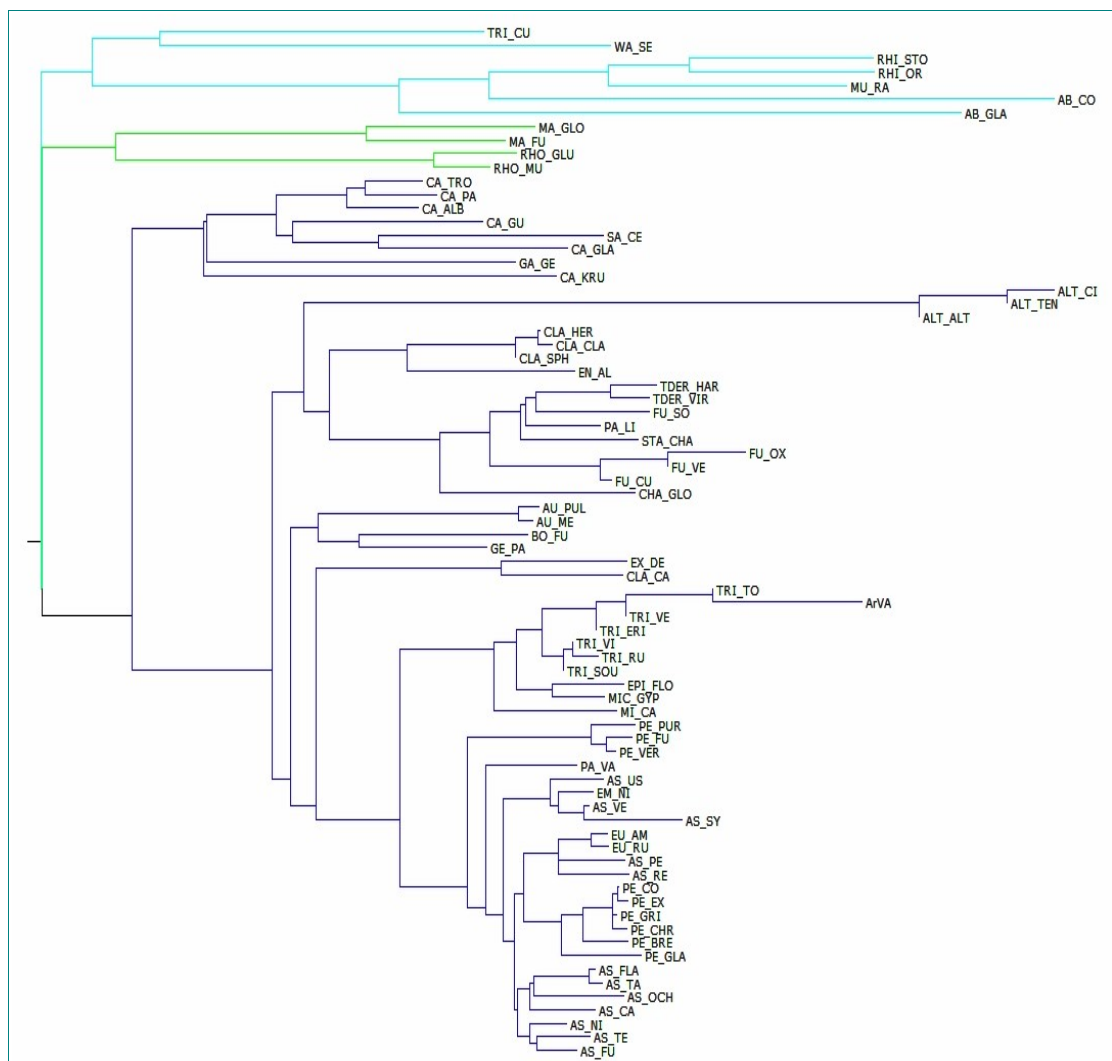


Abbildung 15: phylogenetischer Baum nach Zusammenfassen einiger Organismengruppen

Ebenfalls erkennbar an dem Baum ist das verwandtschaftliche Verhältnis der Organismen zu einander. So sind die Hefen (blau) und die Dermatophyten (grün) klar von den Schimmelpilzen (schwarz) abgegrenzt.

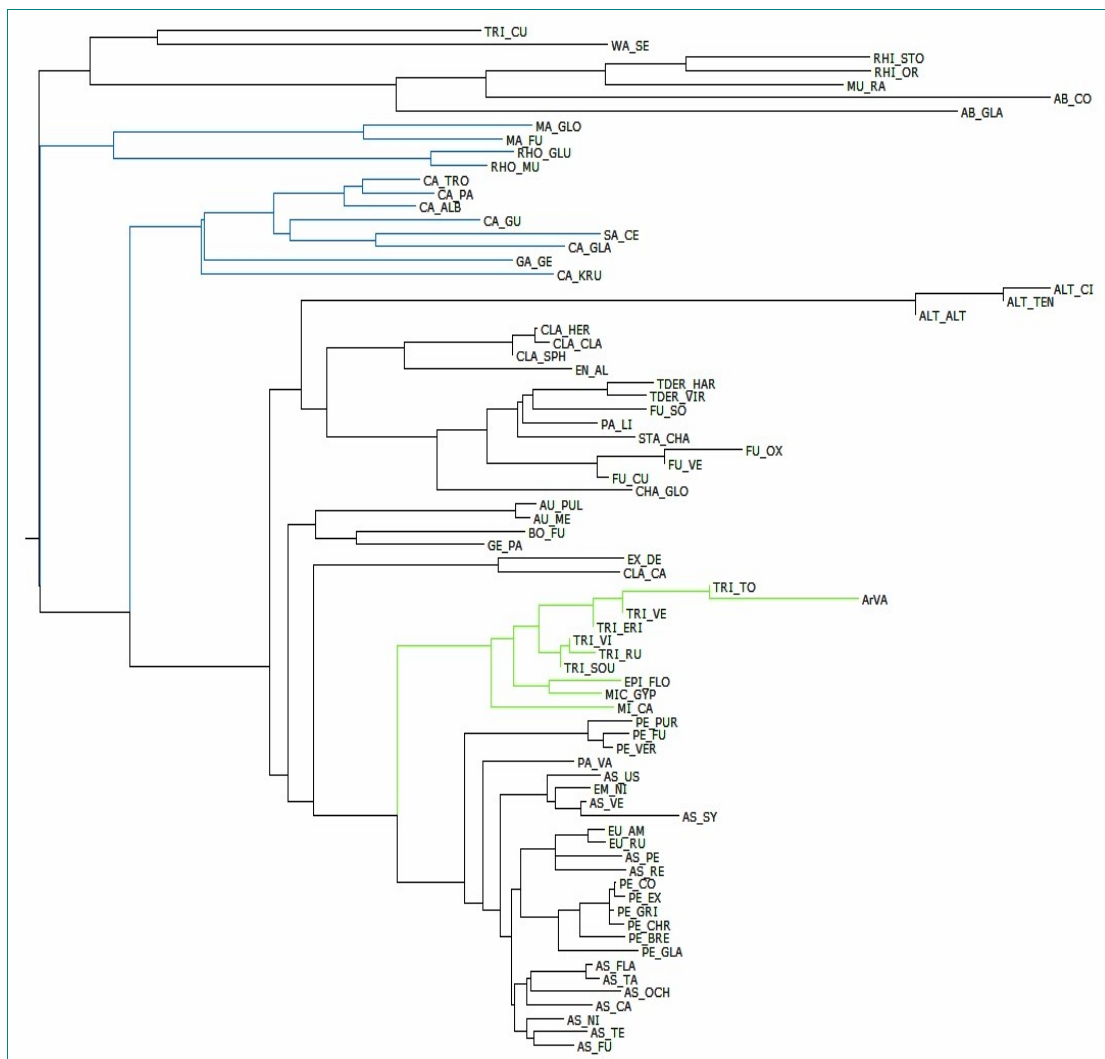


Abbildung 16: Abgrenzung der Pilzgattungen: Schimmelpilze (schwarz), Dermatophyten (grün), Hefen (blau)

### **Candida Nachweis**

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Generierung von Gattungsprimer, die nur eine bestimmte Pilzgattung amplifizieren. In Kombination mit einem Primer, der spezifisch für jede Pilzart verschieden lange Sequenzstücke amplifiziert, kann die Identifikation ebenso erfolgen. Der Nachweis kann z.B. durch Agarosegelelektrophorese der Amplifikate erfolgen.

In Absprache mit der Firma Biotype sollte diese Nachweismethode anhand des erstellten Datenpools näher betrachtet werden. Die zugrunde liegende Fragestellung ist hier die Artdifferenzierung von *Candida spp.* aus Mund- und Urogenitalabstrichen. Dabei wurden folgende Candida Arten betrachtet: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* und *C. tropicalis*. Auf Basis der Kombination der rDNA- mit den ITS-Bereichen dieser Pilzorganismen sollten Primer generiert werden, deren Amplifikate eine Größe von 200 - 1100 Basenpaaren haben und sich um mindestens 20 Basenpaare in ihrer Länge unterscheiden. Diese könnten dann durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden.

Zunächst wurde ein MSA der oben genannten Candida-Arten berechnet, um bereits konservierte Bereiche, als Anhaltspunkt für möglich Primer, aufzuzeigen. Jedoch müssen für ein aussagekräftiges Ergebnis weitere Organismen betrachtet werden. Diese gehören zur natürlichen Flora von Schleimhäuten oder können durch äußere Einflüsse vorhanden sein. So zum Beispiel können im Bereich der Mundschleimhaut Vertreter wie *Penicillium roquforti* oder *Aspergillus oryzae* auftreten, da sie über die Nahrung aufgenommen werden. Genauso muss die menschliche DNA im Bereich des rRNA-Operons mit aufgenommen werden, da sie in jeder Probe automatisch mit vorhanden ist und keine Kreuzreaktion damit auftreten sollen. All diese Sequenzen wurden in ein neues Alignment mit einbezogen. Im Folgenden (Abb.17) ist eine Übersicht des Alignment aller relevanten Organismen dargestellt. Das MSA umfasst lediglich die Bereiche 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA und ITS2. Der 28S rDNA Bereich wurde aufgrund der schlechten Datenlage auch hier nicht mit einbezogen. In der graphischen Übersicht zur Konservierung des Alignment ist zu erkennen, dass in den 18S rDNA Bereichen eine starke Konservierung vorliegt. Es sollte dort möglich sein, einen Bereich zu finden, der die Candida-Arten von den anderen Organismen abgrenzt. Dies zeigt auch das Ergebnis des berechneten phylogenetischen Baumes in Abb. 18.

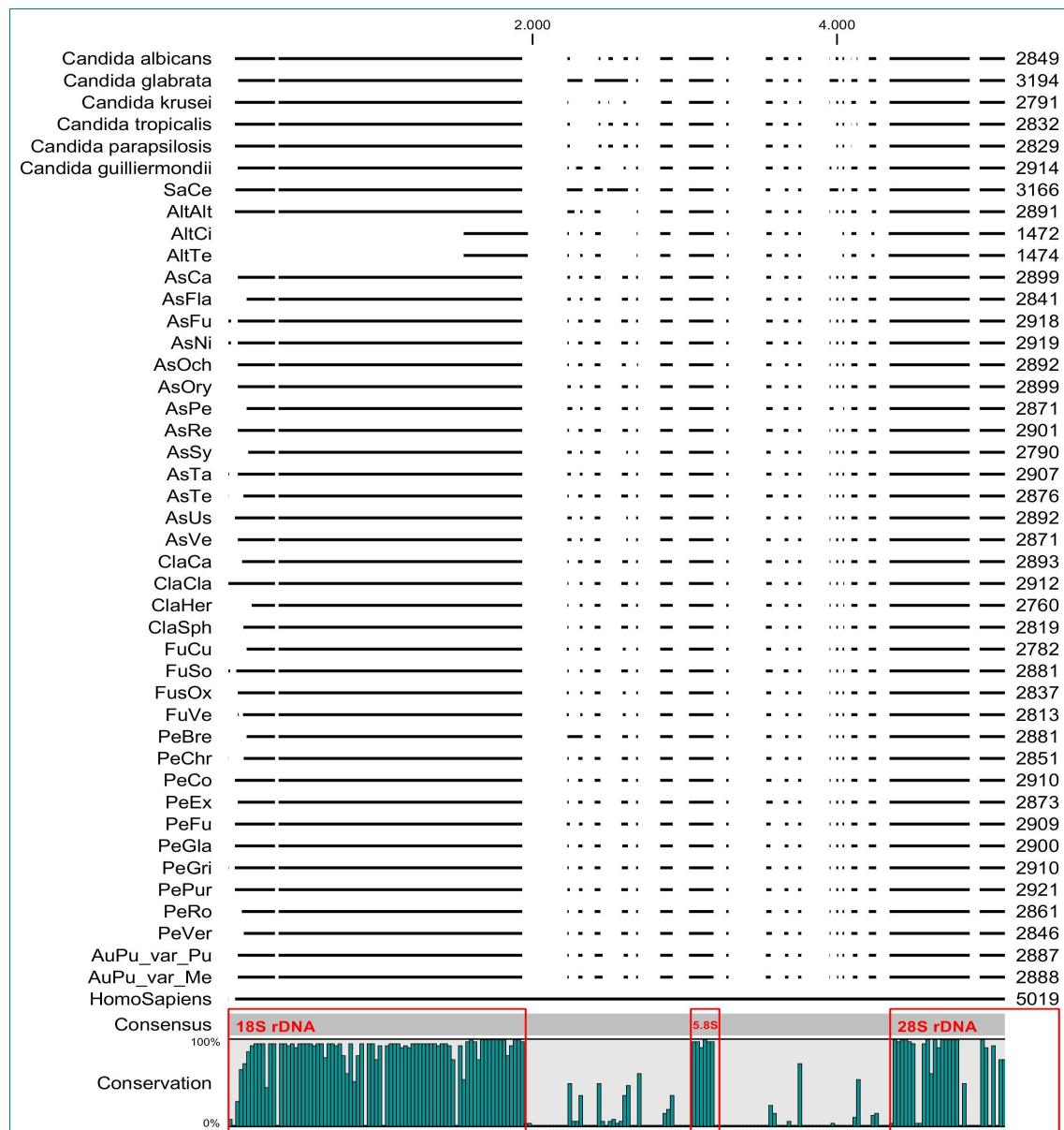


Abbildung 17: Übersicht des MSA aller Organismen die für die Candida Identifizierung nötig sind

Anhand des Baumes ist zu erkennen, dass die Candida-Arten auf einem Zweig des Baumes liegen und damit näher miteinander verwandt sind als mit den Arten der Ausschlussorganismen. Des weiteren liegt es nahe, dass sie in ihrer Sequenz (rRNA) Homologien besitzen, in denen sie sich von den anderen hier aufgeführten Organismen unterscheiden.

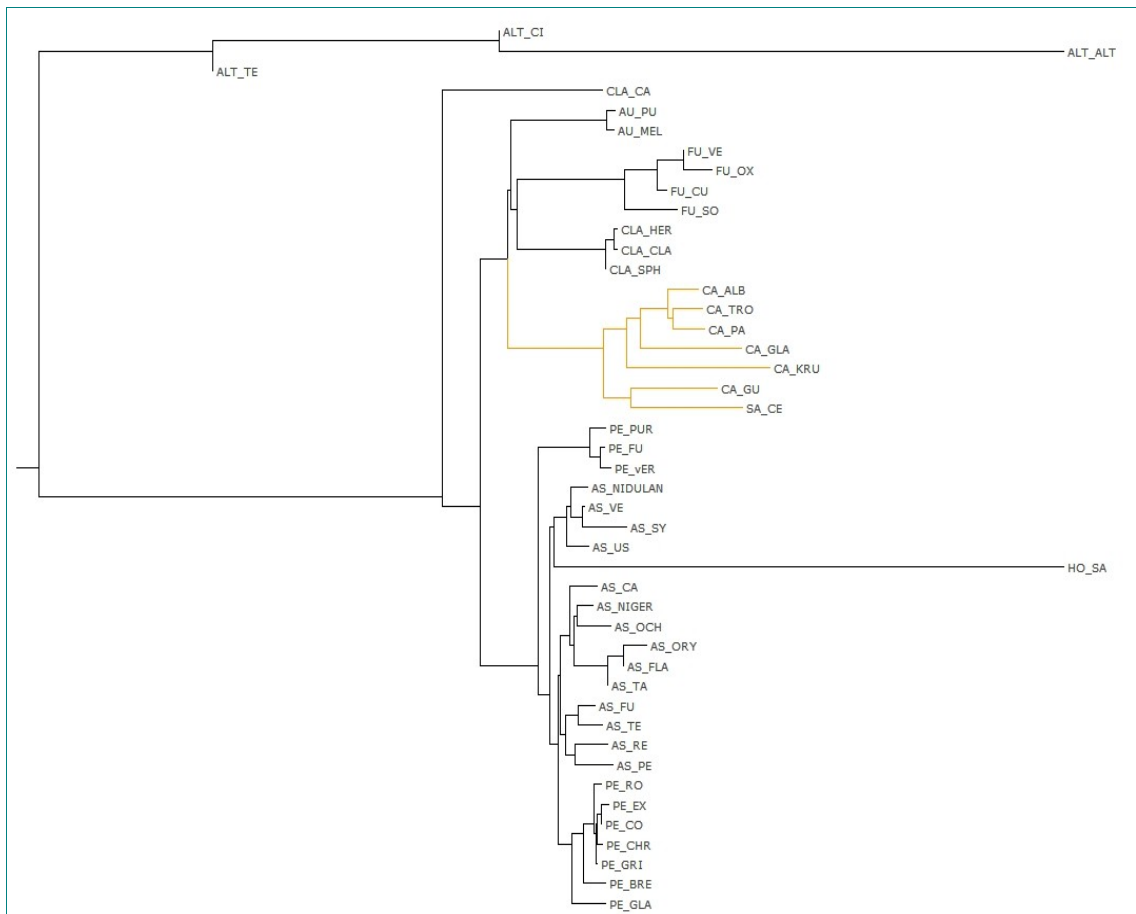
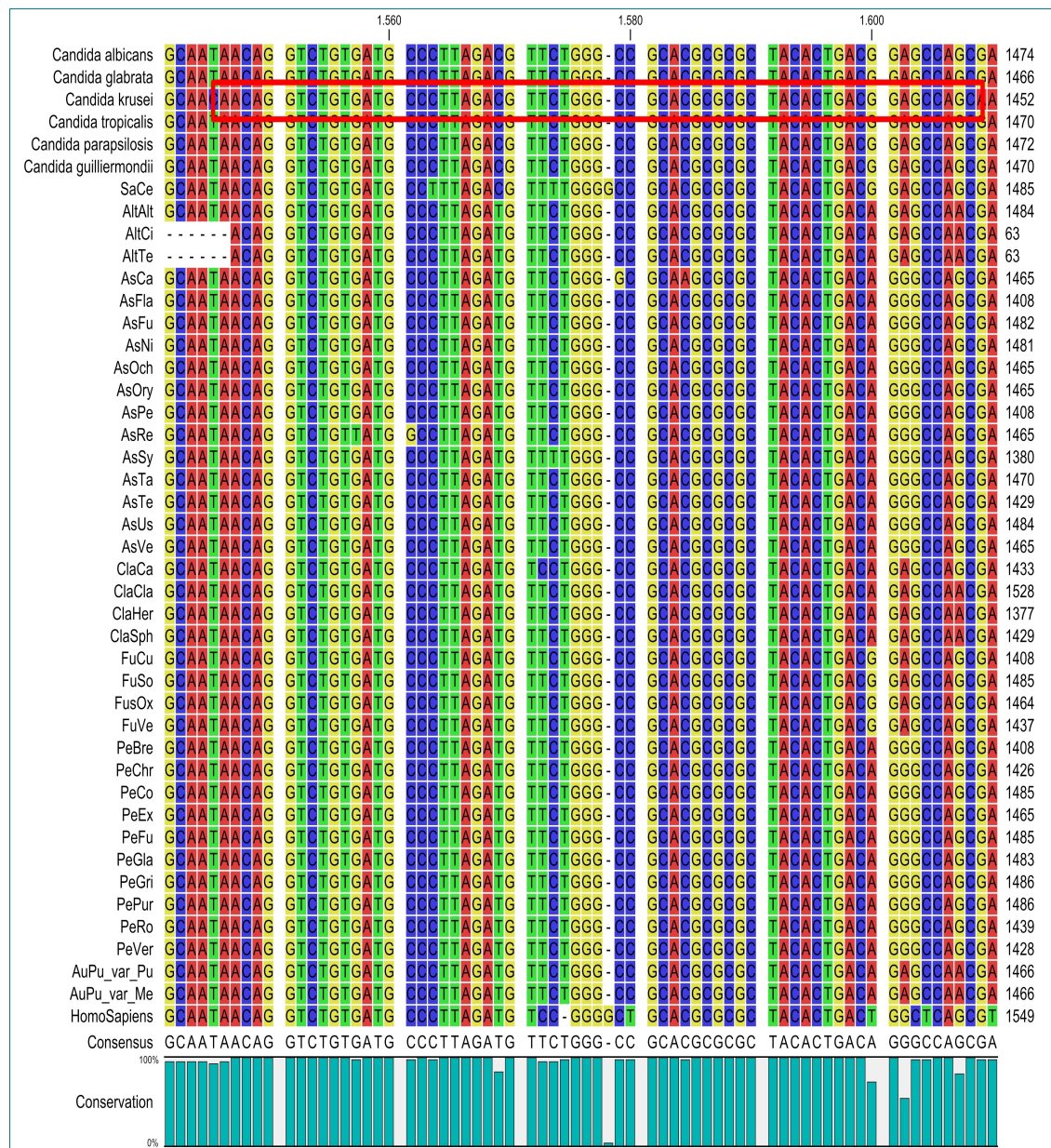


Abbildung 18: Candida Baum

Es war so möglich Sequenzabschnitte für Primer zu finden, die in den Ausschlussorganismen nicht vorkamen. Anhand des Alignments ließen sich nun solche Sequenzbereiche zeigen. Schwierigkeiten bereiteten die Sequenz von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, da sie sehr nah mit den Candida-Arten verwandt ist. Problematisch war es, einen solchen Sequenzabschnitt zu finden, der ausschließlich die Candida-Arten abgrenzte. Dies zeigte sich auch im Alignment (beigefügte CD). In diesem Alignment ließ sich nur ein Sequenzabschnitt finden, der die Candida-Arten nicht nur von den nicht Hefe-Arten sondern auch von *Saccharomyces cerevisiae* abgrenzte.





Der Bereich von 1542 Basenpaaren – 1605 Basenpaaren im MSA: AACAGGTC TGTGATG**GCCCTTAGACGTTCTGGGC**CGCACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAGC ermöglicht ein Primerdesign ausschließlich für die *Candida* Arten. In dem oben gezeigten Sequenzabschnitt stellt der gelb unterlegte Bereich den möglichen forward Primer dar. Dieser wurde durch das Programm Primo Pro 3.4 [P4] berechnet. Er besitzt eine Schmelztemp  $T_m$  von 66°C und durch einen hohen GC-Gehalt (60%) entsteht eine feste Bindung zum Target während der Amplifikation. Die grünen C zeigen die Abgrenzung zu *Saccharomyces cerevisiae* und das blaue C zu den anderen Ausschlussorganismen.

Anhand dieses Primers, der nur an der rRNA der Candida-Arten amplifiziert, kann nun ein zweiter Primer, spezifisch für die jeweilige Candida-Art, gesucht werden. Dieser soll es möglich machen, verschieden große Amplifikate zu synthetisieren. Die Vorgabe besteht darin, Größenunterschiede der Amplifikate von mindestens 20 bp zu erzeugen. Dabei sollen sie eine minimale Größe von 200 bp haben und maximal eine Länge von 1100 bp. Zur Erzeugung der Primer (reverse) für die einzelnen Candida-Arten wird das selbe Programm wie bereits zuvor (forward Primer) genutzt. Im Ergebnis ist eine Übersicht dargestellt (Tab. 3) die zu jeder Candida-Art das Primerpaar und die dazu gehörige Fragmentlänge des Amplifikats zeigt.

Organismus	mögliches Primerpaar	Fragmentlänge
<i>Candida glabrata</i>	fwd.:TGCCCTTAGACGTTCTGGGC rev.: TCACTGGTCCTCCCCAGAG	424 bp
<i>Candida albicans</i>	fwd.:TGCCCTTAGACGTTCTGGGC rev.: GTTTAGACCTCTGGCGGCAG	452 bp
<i>Candida guilliermondii</i>	fwd.:TGCCCTTAGACGTTCTGGGC rev.: ACCTCTGGCCCAACCTATCTC	476 bp
<i>Candida krusei</i>	fwd.:TGCCCTTAGACGTTCTGGGC rev.: CGCACGCGCAAGATGGAAAC	639 bp
<i>Candida tropicalis</i>	fwd.:TGCCCTTAGACGTTCTGGGC rev.: CTTTCAAACAAACCTAGCGTATTG	715 bp
<i>Candida parapsilosis</i>	fwd.:TGCCCTTAGACGTTCTGGGC rev.: AGGTCTGGGACATCTCATCGC	1044 bp

Tabelle 3: Übersicht der forward und reverse Primer zur Candida Identifizierung



## 5 Diskussion

Die Identifizierung von Pilzen gehört nach wie vor zu den schwierigsten Aufgaben des mykologischen Labors. Klassische Nachweismethoden in der Routine - Pilzdiagnostik umfassen mikroskopische, kulturelle, serologische und verschiedene histologische Untersuchungsmethoden. Eine genaue Erregerdifferenzierung ist oft schwierig, da sie abhängig von schwer abzugrenzenden morphologischen Artunterschieden, physiologischen Parametern, von fehlenden phänotypischen Charakteristika und auftretenden Pleomorphismen und auch von der Erfahrung des Personals im Pilzlabor ist. Ebenso stellen das langsame Dermatophyten-Wachstum und die zeitaufwändigen konventionellen Diagnosemethoden große Einschränkungen dar, eine gezielte und rasche Therapie einzuleiten. Verfahren auf molekularer Basis, wie Gensondentechniken oder PCR ermöglichen eine schnelle und eindeutige Identifikation des Erregers und bieten deutliche Vorteile in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit des Pilz-Nachweises.

### **Auswahl des rDNA Operons**

Im Vergleich zu anderen, betrachteten Zielgenen wurde die rRNA Bereits in vielen Projekten zur Pilzidentifikation als Zieltarget der PCR genutzt, besonders die variablen ITS1 und ITS2 Bereiche [16][26][37], gekoppelt mit verschiedenen Detektionsverfahren wie Elektrophorese, ELISA und Fluoreszenzmarkierung konnten die unterschiedlichsten Pilzorganismen identifiziert werden.

Entscheidend für die Auswahl des Zielgens war letztendlich die Datenlage in den bekannten Sequenzdatenbanken. Von ca. 76 % der Organismen waren nahezu vollständige rRNA-Operonsequenzen vorhanden (Abb. 20).

In den bisherigen Nachweismethoden mittels rRNA lag der Fokus vor allem auf Aspergillus- und Candida-Arten [1][8][41], andere medizinisch relevante Arten fanden kaum Beachtung. Das Ziel ist es jedoch noch schnellere, genauere und günstigere Tests mit einem großen Erregerspektrum für die Routine zu entwickeln. Dazu wurde ein Datenpool an rRNA-Operon Sequenzen entwickelt, der eine große Anzahl an medizinisch relevanten Organismen enthält. Es hat sich gezeigt, dass das rRNA-Operon das am besten erforschteste und am häufigsten verwendete Zielgen zum Erregernachweis ist und dessen Daten für viele Organismen bereits in Datenbanken zugänglich ist.

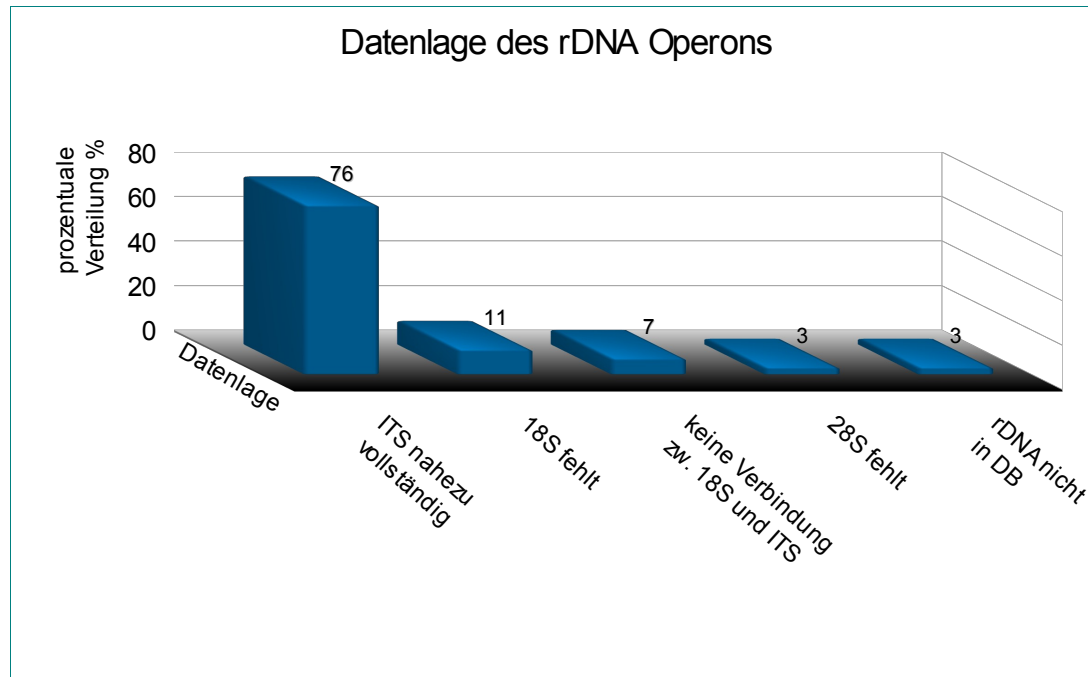


Abbildung 20: Graphik zur Datenlage des rDNA Operons

Die Wahl des Bereiches im Zielgen, welcher amplifiziert werden soll, ist für die Nachweismethode entscheidend. Genauer der Bereich im Zielgen, der den Pilz von anderen Pilzorganismen abgrenzt. So beschreiben Turenne et al. und De Baere et al. beispielsweise die Identifikation von Hefen (v.a. *Candida*) anhand von der Länge des ITS2-PCR-Produkts durch Kapillarelektrophorese [9][24][37]. Ebenso war es möglich die Sequenzierten ITS- oder rRNA Gendaten mit Einträgen von Sequenzdatenbanken (GenBank) zu vergleichen und so eine Erregeridentifizierung zu erlangen. [4][10][16]. Auch gewinnen neuere molekularbiologische Verfahren an Bedeutung, wie der Nachweis des Pilzerregers mittels Chiptechnologie [5][7] in dem DNA-Sonden an einen Chip hybridisiert werden und mittels Fluoreszenzsignalen der Erreger identifiziert wird. Allen gemeinsam ist die Wahl der ITS Bereiche zur artspezifischen Identifizierung. Vor allem der ITS1 Bereich zeigt mehr Variation zwischen den Arten als der ITS 2 Bereich [16][41], was vor allem bei nah verwandten Arten entscheidend ist.

Der erarbeitete Datenpool umfasst eine Anzahl von 76 größtmöglichen rRNA Sequenzen von Pilzorganismen mit einer medizinischen Relevanz. Es war möglich bei den zu entwickelten Nachweisverfahren flexibel zwischen den rRNA Genen oder den ITS Bereichen zu wählen ohne eine umfangreiche und aufwendige Recherche zu betreiben. Die Qualität der ausgewählten Sequenzen fand bei der Erstellung des Datenpools eine besondere Beachtung.

### **Sequenzauswahl**

Die Sequenzdaten sind in einer großen Anzahl in den Datenbanken des NCBI (GenBank) oder des EMBL hinterlegt. Die GenBank enthält 189 Millionen Einträge [2], davon betreffen mehr als 3 Millionen Sequenzdaten Pilzorganismen und 19362 Einträge Informationen über das rRNA-Operon von Pilzen. Die einzelnen Einträge sind als GenBank – Files mit eindeutiger Accession Number hinterlegt.

Der GenBank-File lässt sich in zwei Bereiche unterteilen. Im oberen Teil wird die Annotation gezeigt, Dies beinhaltet Daten wie Quellorganismus, die taxonomische Einordnung des Organismus, genaue Definition der Gen- / Proteinprodukte und die dazugehörigen Referenzen (Veröffentlichungen). Im unteren Teil der Datei ist die Sequenz dargestellt. Neben diesem GenBank-Format kann ebenso das FASTA-Formats ausgewählt werden. Es ist ein einfaches Datenbankformat zur Speicherung von Sequenzdaten. Es besteht aus einer einzelnen Kopfzeile, die mit dem Zeichen „>“ beginnt und eine kurze Beschreibung zeigt, danach folgt die Sequenz, welche für weiteres Arbeit genutzt wird. Die Auswahl der qualitativ besten rRNA Sequenz einzelner Organismen in Annotation und Alignmentqualität stellt einige Schwierigkeiten dar. Zunächst sind einige Daten von rRNA Sequenz nicht hinterlegt (3%, vgl. Abb.20), da sie entweder durch ihre geringe medizinische Relevanz das Interesse von Forschern und Forschergruppen nicht geweckt haben oder eine Sequenzierung problematisch war. Dem liegen meist systematische oder zufällige Fehler zu Grunde. [43]/S. 315] Eine weitere Schwierigkeit bei der Auswahl der rDNA Sequenzen ist die Redundanz der Einträge und die mangelnde Datenqualität und Annotation. Redundante Einträge erschweren die Suche, da ein und die selben Sequenzdaten identisch mit mehreren Einträgen der Datenbank sind oder sich nur in geringem Maß unterscheiden. Das bedeutet, dass diese Daten doppelt vorliegen und zu einer großen Anzahl an Suchergebnissen führen, die den selben Informationsgehalt besitzen. Die mangelnde Datenqualität und Annotation beruht auf Informationen im Eintrag, denen keine direkten experimentellen Daten zugrunde liegen, so dass es zu Fehlern in der in der Annotation oder zum Fehlen dieser kommen kann. Ebenso unterliegen die Datenbanken wie GenBank oder EMBL keiner menschlichen Kontrolle, so dass jeder der Datenbank Sequenzen zuführen kann, egal von welcher Qualität. Um diesen Problemen vorzubeugen, wurde bei der Auswahl der Sequenzeinträge bioinformatische Tools (ClustalW), die Webanwendung Emerencia [34] genutzt und zusätzlich ein Abgleich mit selbst sequenzierten Daten der Firma Biotype vorgenommen.

Nach dem Ausschluss der ungenügend identifizierten Sequenzen über die Web-Anwendung Emerencia wird mit den fraglichen Einträge aus der Datenbanksuche ein MSA berechnet. Deren Konsensussequenz liefert einen ersten Anhaltspunkt und

schließt qualitativ schlechte und redundante Einträge aus. Ebenso wurden diese Sequenzen mit experimentellen Daten der Firma Biotype abgeglichen, so dass im Ergebnis Sequenzen gefunden wurden, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit den genetischen Daten im Organismus entsprechen.

### **Assemblieren**

Mit dem Assemblieren der ermittelten Sequenzdaten gelang es größtmögliche rRNA Bereiche, ohne eine Sequenzierung des gesamten rRNA-Operons praktisch durchgeführt zu haben, zu erhalten. Da Forschergruppen immer nur den Bereich amplifizieren, der für ihre Arbeit von Interesse ist, lagen in den Datenbanken nur einzelne Sequenzteile des rRNA-Operons vor. Zumeist sind das die ITS1 bis ITS2 Bereiche (ITS1 – 5.8S – ITS2), da sie beispielsweise oft für die Identifikation von Pilzorganismen interessant erscheinen. Diese Sequenzen umfassen, abhängig von den genutzten Primern (Standard ITS1 und ITS4, [39]), nur wenige Basen der 18S und 28S rRNA Gene. Anhand derer erfolgt die Assemblierung der ITS Bereichen mit rRNA Genen. Dabei wurden die einzelnen Nucleinsäuren durch Sequenzalignment zu längeren Fragmenten zusammengesetzt. Wichtig dabei ist der Bereich der Überlappung, d. h. die Anzahl der identischen Basen in beiden Sequenzen. Bei der Festlegung der Anzahl an Basen für die Überlappung gilt generell je mehr, desto besser. Problematisch war es, wenn nur eine kleine Anzahl von Basen identisch ist, da diese zufällig in der gleichen Kombination wiederholt im rRNA-Operon auftreten können. Im Vergleich zwischen den gesuchten Pilzorganismen war die Anzahl der Basen für die Überlappung unterschiedlich, unterschritt aber nie 30 Nukleotide.

Das Assemblieren in dieser Arbeit erfolgte manuell, da die Überlappungsbereiche teilweise so gering waren, dass sie von keinem Alignierungsprogramm zuverlässig erfasst wurden. Es wurden die Anfangsbereiche der ITS Sequenz (18S-ITS1–5.8S–ITS2-28S) mit dem Endbereich der 18S rDNA Sequenz und die Endbereiche der ITS Sequenz mit den Anfangsbereichen der 28S rDNA Sequenzen verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass die 18S rDNA mit einer spezifischen Basenfolge ( ... ATCATTA ...) endet und in jedem Pilzorganismus zu finden ist. Dies bildete einen guten Orientierungspunkt für das finden von Überlappungsbereichen zwischen 18S rDNA und ITS Sequenzen. Im Ergebnis konnten 95 % der ermittelten Sequenzen und davon 75 % komplett assembliert werden. Dabei war eine große Variabilität bei den Gesamtsequenzlängen zu beobachten. Begründet ist dies durch das Fehlen der rRNA – Gene von einzelnen Organismen in den Datenbanken. Es betrifft hauptsächlich die 28S rDNA, da es im Gegensatz zu der 18S rDNA und den ITS Bereichen bisher nur

selten im Mittelpunkt der Forschung stand. Diese Unterschiede in der Sequenzlänge des rRNA-Operon, waren, bei der Entwicklung von Strategien und Methoden zur Identifizierung von Pilzen, zunächst nicht von Bedeutung, da hauptsächlich die ITS Bereich oder eine Kombination der ITS Bereiche mit der 18S rDNA genutzt wurden. Allerdings stellte diese Variabilität bei der Erstellung von phylogenetischen Bäumen über das rRNA-Operon ein Problem dar, da durch die verschiedener Sequenzlängen falsche Topologien berechnet wurden.

Bei ca. 7 % der Sequenzen in denen alle rRNA-Operonteile vorlagen konnte nicht assembliert werden, da keine Verbindung zwischen den einzelnen Sequenzabschnitten hergestellt werden konnte (vgl. Abb.20). Dieses Problem trat ausschließlich zwischen den Bereichen der 18S rDNA und ITS1-Sequenzen auf. Diese Lücke kommt durch das Fehlen der Sequenzdaten in der Datenbank zustande, da Forscher und Forschergruppen, wie bereits beschrieben, nur Sequenzen und Organismen von Interesse für ihre Arbeit sequenzieren. Dieses Problem konnte im Verlauf des Projektes nicht behoben werden. Dennoch sind die Sequenzdaten der einzelnen Operon Bereiche hinterlegt (Tab. 13), so dass mit ihnen auch einzeln gearbeitet werden kann.



### **Anwendungsmöglichkeiten**

Die Entwicklung verschiedenster Anwendungsmöglichkeiten und Nachweisverfahren zur Identifikation von humanpathogenen Pilzen anhand des erstellten Datenpools war ein Hauptanliegen dieses Projektes. Im Folgenden sind die Grundlagen für zwei solche Anwendungsmöglichkeiten anhand der ermittelten Ergebnisse auf der Basis des Datenpools beschrieben. Zum einen wurde ein DNA-Sonden-Hybridisierungsansatz (Chiptechnologie) und zum anderen eine PCR-Fragmentanalyse betrachtet. Beide Ansätze bilden jeweils die theoretische Grundlagen für einen Nachweis und müssen durch eine praktische Durchführung noch erprobt werden.

### **DNA Sonden Hybridisierung**

In diesem Ansatz findet, je nach Kundenwunsch, die Identifikation von einer großen Anzahl von Organismen statt. Es wird anhand von generierten Primern das Zielgen aus dem Organismus herausgeschnitten und amplifiziert. Dies kann sowohl mit Primern realisiert werden, die allgemein das rRNA-Operon eingrenzen oder es können hier bereits gattungsspezifische Primer eingesetzt werden. Danach werden in den variablen Bereichen der ITS1- und ITS2-Region artspezifische Sonden generiert, die auf einem Mikrochip hybridisieren und an denen die Amplifikate binden. Mittels eines Fluoreszenzsignals der Sonden kann dann die Art des Pilzes eindeutig nachgewiesen werden. Auf der Grundlage des Datenpools wurde mit denjenigen rDNA Sequenzen, der gewünschten Organismen, ein MSA berechnet, um konservierte und variable Bereiche aufzuzeigen in denen ein Primer- bzw. Sondendesign statt finden kann. Im erzeugten MSA (vgl. Abb. 11) waren die einzelnen Abschnitte des rRNA-Operons gut zu erkennen. Jedoch war auch deutlich zu sehen, dass es nicht möglich war für alle gesuchten Organismen ein Primerpaar zu finden. Im nächsten Schritt wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, der, bezüglich des Zielgens, die verwandtschaftlichen Verhältnisse darstellte. Hier traten erste Schwierigkeiten auf, da wie zuvor bereits beschrieben Sequenzen aus dem Datenpool verschiedene Gesamtlängen besitzen und große Teile der 28S rDNA nicht erfasst wurden. So dass für die Berechnung des phylogenetischen Baumes die Sequenzen gekürzt wurden und auch nur diese verkleinerten Bereiche (ca. 3500 bp) für die Berechnung und das Primerdesign zur Verfügung standen. Anhand des molekularen Baumes wurden Gruppen zusammengefasst, für die sich Primerpaare generieren lassen. Dies geschah in einem weiteren Teilprojekt zu diesem Thema. Auch die Entwicklung spezifischer Sonden erfolgt an anderer Stelle. Allerdings ist in der Literatur bereits belegt, dass sich die ITS1-Bereiche, zur eindeutigen Identifikation der Pilzorganismen, hervorragend eignen.

## Candida Nachweis

In diesem zweiten Ansatz sollten pathogene Candida-Arten auf Schleimhäuten und im Urogenitaltrakt des Menschen mittels einer PCR und anschließender Fragmentlängenanalyse identifiziert werden. Mit einem Alignment aller fraglichen Candida-Arten (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* und *C. tropicalis*) und solcher Arten (*Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium* spp. (besonders *Penicillium roquforti*), *Aspergillus* spp. (bes. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*), *Cladosporium* spp., *Aureobasidium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp.), die aufgrund ihres natürlichen Vorkommens ausgeschlossen werden mussten, konnten auch hier zunächst konservierte und variable Bereiche des rRNA-Operons gezeigt werden. Der Grundgedanke war einen konservierten Primer zu finden, der alle Candida-Arten amplifiziert und gleichzeitig die Organismen der Begleitflora nicht erkennt. Im Alignment Abb. 19 wird dieser forward Primer ausschließlich im Bereich der 18S rDNA gesucht. Dies hatte den Vorteil, dass der hier eingesetzte forward Primer, die variablen ITS1 und ITS2 Regionen amplifiziert. Der Bereich in der Sequenz, der ausschließlich die Candida-Arten amplifiziert ist: GACGTTTTGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAGC). Um andere Primer-Varianten praktisch testen zu können lag die Überlegung nahe, die eng verwandte Art *Saccharomyces cerevisiae* für die Primergenerierung mit einzuschließen, da dadurch eine größere Vielfalt an Primern ermöglicht wird. Im weiteren wurden reverse Primersequenzen gesucht, die die Pilzspezies eindeutig identifizierten. Dazu wurden die variablen Bereiche des Operons (ITS1 und ITS2) näher betrachtet. In diesen wurden ebenso Abschnitte gesucht, welche aber nun die Candida-Art spezifisch identifizieren, unter der Bedingung das verschieden große Amplifikate, für jede einzelne Candida Art, entstehen. Im Vergleich zu anderen Arbeiten richtete sich die Amplifikatgröße nicht nach der Sequenzlänge der ITS1 und ITS2 Regionen [6][37] sondern schloss sie nur teilweise ein und wird mit Bereichen der 18S rDNA kombiniert. So kann ein Nachweis der Art, sowohl durch konservierte als auch variable Bereiche der Sequenz erfolgen. In einem ersten Versuch ist dies auch gelungen. Es entstand Amplifikate mit einer Größe von 424 bp – 1044-bp (vgl. Tab. 3). Aufgrund der verschiedenen Fragmentlängen mit einem Größenunterschieden von mehr als 20 bp zueinander, kann eine Elektrophorese als Detektionsmethode angeschlossen werden. Anhand der Banden auf dem Gel wäre es möglich den Pilzorganismus eindeutig zu identifizieren, da das Primerpaar spezifisch für jede Candida-Art PCR-Produkte bildet. Gleichzeitig ist eine quantitative Einschätzung der Probe möglich. Das bedeutet einen entscheidenden Vorteil, da Candida-Arten zur natürlichen Flora des menschlichen Organismus gehören und somit ständig auftreten.



## 6 Zusammenfassung/Ausblick

Obwohl Pilzerkrankungen seit über 150 Jahren bekannt sind, gehören sie immer noch zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. [53]/S.82] Neben Haut und Schleimhautmykosen haben vor allem systemische Mykosen eine entscheidende Bedeutung. Besonders problematisch sind sie bei Patienten auf Intensivstationen. Sie treten häufig bei immunsuppressiven Patienten auf und rufen im schlimmsten Fall eine Sepsis hervor. Haupterreger solcher Erkrankungen sind Candida- und Aspergillus-Arten. Aber auch andere Pilzorganismen können schwere Erkrankungen des menschlichen Organismus hervorrufen und wirken damit humanpathogen. Sie haben eine toxische Wirkung durch ihre Stoffwechselprodukte bzw. Zellbestandteile oder wirken allergen. In dieser Arbeit wurde ein breites Spektrum solcher humanpathogenen, allergenen und toxinogenen Organismen betrachtet, um eine ebenso breite Menge an Erregern zu identifizieren und darauf folgende Erkrankungen abzudecken. Es wurde ein Datenpool erstellt, der 76 nahezu vollständige Sequenzdaten über ein vorher ausgewähltes Zielgen – rRNA-Operon – enthält und anhand dessen weitere molekularbiologische Nachweisverfahren zur Identifizierung von eben diesen Pilzen erfolgen kann. Im Vergleich zu konventionellen Methoden, die oft sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und stark von der Erfahrung des Fachpersonals im mykologischen Labor abhängen, bieten molekularbiologische Nachweise ein eindeutiges Ergebnis mit hoher Spezifität und Sensitivität. Der entscheidende Vorteil, der auf PCR-basierenden Methoden, ist das schnelle Ergebnis, da hier die DNA des Erregers direkt nachgewiesen wird und nicht dessen Stoffwechselprodukte oder deren erwachsene vegetativen Formen (Hyphen und Myzelien). So ist das Einleiten von Therapien zeitnah möglich, was bisher mit konventionellen Methoden, vor allem bei Patienten mit invasivem Mykosen, schwierig war.

Im Ergebnis dieser Arbeit ist ein Datenpool von 76 Organismen entstanden, mit dessen Hilfe ein effektiver molekularbiologischer Nachweis, zur Identifizierung humanpathogen, allergener und toxinogener Pilzorganismen, entwickelt werden kann. In dieser Arbeit wurden die theoretischen Grundlagen für zwei solcher Nachweisverfahren, anhand verschiedener Fragestellungen gezeigt. Im Falle des Candida-Nachweises auf Haut und Schleimhäuten können auch erste praktische Versuche angeschlossen werden. Ebenso wäre es im weiteren möglich ein Programme zu entwickeln, das das alignieren und assemblieren von Einträgen aus Datenbanken automatisiert. Dies führt zum einen zur Gewinnung von Datenqualität und zum anderen ermöglicht es eine Erweiterung des bestehenden Datenpools.



## 7 Anlage

Anlage Teil 1	A-II
Anlage Teil 2	A-V
Anlage Teil 3	A-IX

## Anlage: Teil 1

Die gezeigten Tabellen 4-8 stellen eine Übersicht über die Datenlage der Zielgene in den Datenbanken dar. Es wird der lateinische Name des Organismus und deren verkürzte Schreibweise genannt. Diese abgekürzten Namen wurden im gesamten Verlauf des Projektes genutzt und beibehalten. Bei den mit „x“ markierten Feldern lagen Sequenzdaten vor und in leeren Feldern nicht. In der Spalte des rRNA-Operons sind zusätzlich noch Begründungen für das Fehlen bzw. das spätere erfolglose Assemblieren der Daten angegeben.

Organismus	Abk.	ITS-Operon	beta Tubulin	Chitin synthase	Chitinase	Cytochrom Oxidase
<i>Epidermophyton floccosum</i>	EpiFlo	x		x		
<i>Geomyces pannorum</i> ( <i>Chrysosporium pannorum</i> )	GePa	x				
<i>Microsporum canis</i>	MiCa	x	x	x	x	
<i>Microsporum gypseum</i>	MiGyp	x	x	x		
<i>Mikrosporum vanbreuseghemii</i>	ArVa	x		x		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> var. <i>asteroides</i> var. <i>erinacei</i>	TriEri	x		x		
<i>Trichophyton rubrum</i>	TriRu	x	x	x	x	
<i>Trichophyton soudanense</i>	TriSou	x	x			
<i>Trichophyton tonsurans</i>	TriTo	x	x	x		
<i>Trichophyton verrucosum</i>	TriVe	x	x	x	x	
<i>Trichophyton violaceum</i>	TriVi	28S nicht in DB	x	x		

Tabelle 4: Verteilung der Zielgene in Datenbanken – Dermatophyten

Organismus	Abk.	ITS-Operon	beta Tubulin	Chitin synthase	Chitinase	Cytochrom Oxidase
<i>Hormoconis resinae</i> ( <i>Amorphotheca resinae</i> )	HoRe	keine 18S in DB				
<i>Malassezia furfur</i>	MaFu	x		x		
<i>Malassezia globosa</i>	MaGlo	x	2 hypot. Proteine	x		
<i>Exophiala dermatitidis</i>	ExCu	x		x		
<i>Candida (Pichia) guilliermondii</i>	CaGu	x	hypot. Protein	x	x	
<i>Candida albicans</i>	CaAlb	x	x	x	x	
<i>Candida glabrata</i>	CaGla	x	3 hypot. Proteine			
<i>Candida krusei</i> (teleomorph: <i>Issatchenkia orientalis</i> )	CaKru	x				
<i>Candida parapsilosis</i>	CaPa	x				
<i>Candida tropicalis</i>	CaTro	x		x	x	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	RhoGlu	x	x			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	RhoMu	x				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SaCe	x	x	x		x

Tabelle 5: Verteilung der Zielgene in Datenbanken – Hefen

Organismus	Abk.	Genom	ITS-Operon	beta Tubulin	Chitin synthase	Chitinase	Cytochrom Oxidase
Homo Sapiens	Mensch	ja	x	x			x
Canis lupus familiaris	Hund	ja	x	x			x
Felis catus	Katze	ja		x			
Mus musculus	Maus	ja	x	x			x
Bos Taurus	Rind	ja	x	x			x
Sus scrofa	Schwein	ja		x			x
Equus ferus caballus	Pferd	ja					
Rattus rattus	Ratte	ja		x			x
Gallus gallus	Huhn	ja	x	x			x

Tabelle 6: Ein- und Ausschlussorganismen

Organismus	Abk.	ITS-Operon	beta Tubulin	Chitin synthase	Chitinase	Cytochrom Oxidase
<i>Absidia corymbifera</i>	AbCo	x	x			
<i>Absidia glauca</i>	AbGla	x				
<i>Acremonium alternatum</i>	AcAlt	rRNA Bereiche nicht in DB				
<i>Acremonium kiliense</i>	AcKi	rRNA Bereiche nicht in DB				
<i>Acremonium murorum</i>	AcMu	rRNA Bereiche nicht in DB				
<i>Acremonium strictum</i>	AcStri	rRNA Bereiche nicht in DB	x			
<i>Alternaria alternata</i> A7	AltAlt	x	x			
<i>Alternaria citri</i>	AltCi	x				
<i>Alternaria mali</i>	AltMa	x				
<i>Alternaria tenuissima</i>	AltTe	x	x			
<i>Aspergillus caesiellus</i>	AsCae	rRNA Bereiche nicht in DB	x			
<i>Aspergillus candidus</i>	AsCa	x	x			
<i>Aspergillus flavus</i>	AsFla	x	x	x	x	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AsFu	x	x	x	x	
<i>Aspergillus nidulans</i>	EmNi	x	x	x	x	
<i>Aspergillus niger</i>	AsNi	x	x	x	x	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	AsOch	x	x			
<i>Aspergillus penicillioides</i>	AsPe	x	x			
<i>Aspergillus restrictus</i>	AsRe	x	x			
<i>Aspergillus sydowii</i>	AsSy	x	x			
<i>Aspergillus tamarii</i>	AsTa	x	x			
<i>Aspergillus terreus</i>	AsTe	x	x	x		
<i>Aspergillus ustus</i>	AsUs	x	x			
<i>Aspergillus versicolor</i>	AsVe	x	x			
<i>Aureobasidium pullulans</i> var <i>pullulans</i>	AuPu_var _pul	x	x			
<i>Aureobasidium pullulans</i> var <i>melanigeum</i>	AuPu_var _mel	x	x			
<i>Botrytis cinerea</i>	BoFu	x	x	x	x	
<i>Chaetomium brasiliense</i>	ChaBra	rRNA Bereiche nicht in DB				
<i>Chaetomium globosum</i>	ChaGlo	x	x	x	x	
<i>Chaetomium murorum</i>	ChaMu	rRNA Bereiche nicht in DB	x			
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	ClaCla	x	x			
<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	ClaSph	x	x			
<i>Cladosporium carrionii</i> (syn. <i>Cladophialophora</i> )	ClaCa	x	x			
<i>Cladosporium herbarum</i>	ClaHer	x	x			
<i>Engyodontium album</i>	EnAl	x				
<i>Eurotium amstelodami</i>	EuAm	x	x			
<i>Eurotium chevalieri</i>	EuChe	18S nicht in DB	x			

Tabelle 7: Verteilung der Zielaene in Datenbanken – Schimmelpilze I



Organismus	Abk.	ITS-Operon	beta Tubulin	Chitin synthase	Chitinase	Cytochrom Oxidase
<i>Eurotium rubrum</i>	EuRu	x	x			
<i>Aspergillus rubrobrunneus</i> siehe <i>Asp. Rubrum (repens)</i>						
<i>Fusarium culmorum</i>		x	x			
<i>Fusarium oxysporum</i>	FuOx	x		x		
<i>Fusarium solani</i>	FuSo	x				
<i>Fusarium verticillioides</i> ( <i>Gibberella moniliformis</i> )	FuVe	x	x	x		
<i>Geotrichum candidum</i> / <i>Galactomyces geotrichum</i>	GaGe	x	x			
<i>Mucor plumbeus</i>	MuPlu	rRNA Bereiche nicht in DB				
<i>Mucor racemosus</i>	MuRa	x	x			
<i>Oidiodendron griseum</i>	OidGri	rRNA Bereiche nicht in DB				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	PaLi	x	x		x	
<i>Paecilomyces variotii</i>	PaVa	x	x			
<i>Penicillium brevicompactum</i>	PeBre	x	x			
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ( <i>Penicillium aurantiovirens</i> )	PeAu	18S nicht in DB	x			
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PeChr	x	x	x		
<i>Penicillium commune</i>	PeCo	x	x			
<i>Penicillium digitatum</i>	PeDi	rRNA Bereiche nicht in DB	x			
<i>Penicillium expansum</i>	PeEx	x	x			
<i>Penicillium funiculosum</i>	PeFu	x				
<i>Penicillium glabrum</i>	PeGla	x	x			
<i>Penicillium griseofulvum</i>	PeGri	x	x			
<i>Penicillium marneffei</i> (RK3)	PeMa	18S nicht in DB	putativ	x	x	
<i>Penicillium piceum</i>	PePi	28S nicht in DB, 18S // ITS1				
<i>Penicillium purpurogenum</i>	PePur	x	x			
<i>Penicillium verruculosum</i>	PeVer	x				
<i>Phialophora fastigiata</i> ( <i>Cadophora fastigiata</i> )	PhiFa	18S nicht in DB				
<i>Phialophora heteromorpha</i>	PhiHe	keine eindeu- tigen Daten				
<i>Phoma glomerata</i>	PhoGlo	p18S // ITS1	x			
<i>Rhizopus oryzae</i>	RhiOr	x	x			
<i>Rhizopus stolonifer</i>	RhiSto	x	x	x		
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	ScoBre	rRNA Bereiche nicht in DB				
<i>Scopulariopsis fusca</i>	ScpFu	keine Daten in DB				
<i>Stachybotrys chartarum</i>	StaCha	x	x	x		
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	SynRa	keine/ unter- schiedliche ITS Bereiche in Db	x			
<i>Trichoderma harzianum</i> ( <i>Hypocrea lixii</i> )	tDerHar	x	x		x	
<i>Trichoderma viride</i> ( <i>Hypocrea rufa</i> )	tDerVir	x	x		x	
<i>Verticillium</i> / <i>Lecanicillium lecanii</i>	LeLe	p18S // ITS1			x	
<i>Wallemia sebi</i>	WaSe	x				

Tabelle 8: Verteilung der Zielgene in Datenbanken – Schimmelpilze II

## Anlage: Teil 2

In den folgenden Tabellen sind die Accession numbers der rRNA-Sequenzen der Einträge zu allen Organismen gezeigt. Außerdem sind die Größen der assemblierten Sequenzen aufgeführt, ebenso wie das Vorhandensein von genomischen Daten. Einträge die nicht assembliert werden konnten sind zusätzlich, mit der Begründung, in Tabelle 13 ersichtlich.

Organismus	Abk	18S	ITS Bereich	28S	Bp	Genom
<i>Epidermophyton floccosum</i>	EpiFlo	EF631604	EF631604	AY176734	3402	nein
<i>Geomyces pannorum</i>	GePa	AY129548 AB015785	HQ115661	HQ115661	2905	nein
<i>Microsporum canis</i>	MiCa	ABVF01000122: 4502-6304	AJ252329, EU181444, AB193630	ABVF01000122: 33587-37522	5706	ja
<i>Microsporum gypseum</i>	MiGyp	ABQE01000222: 314-2116	EU151494, GU291264, EU181456	ABQE01000222: 2332-5942	5942	ja
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> var. <i>asteroides</i> var. <i>erinacei</i>	TriEri	EF631615	FJ428243, EF631615	AB458183, AY176741	3299	ja
<i>Mikrosporum vanbreuseghemii</i>	ArVa	AB566303	AB566303, AF170466, AB458207, AB193720	AB458207	1631	nein
<i>Trichophyton rubrum</i>	TriRu	X58570	Z97993, AF170472, EF631619, GQ376106	AY176744	3378	ja
<i>Trichophyton soudanense</i>	TriSou	EF631621	EF631621	EF078485	2937	nein
<i>Trichophyton tonsurans</i>	TriTo	ACPI01000596: 2929-4732	EF043272, AF170479	ACPI01000596: 13823-17385	5627	nein
<i>Trichophyton verrucosum</i>	TriVer	EF631623	AF168126	AY234993	2930	ja

Tabelle 9: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Dermatophyten

Organismus	Abk	18S	ITS Bereich	28S	Bp	Genom
<i>Malassezia furfur</i>	MaFu	EU192363	AY743635	HM014475 AY745725	3708	nein
<i>Malassezia globosa</i>	MaGlo	EU192364	AY743630, GU291271	AAYY01000016	5638	ja
<i>Exophiala dermatitidis</i>	ExCu	X80702	AF050270, DQ826738, FJ387565	DQ823100	4178	ja
<i>Candida (Pichia) guilliermondii</i>	CaGu	EU784644, AB013587	AM160625		2955	ja
<i>Candida albicans</i>	CaAlb	X53497	GU319991, FJ159679, AY939786	X70659	5376	ja
<i>Candida glabrata</i>	CaGla	AY198398	AY198398, GQ376080, AB305094	FN428886	7324	ja
<i>Candida krusei</i>	CaKru	YSASRRNAC	DQ674351, AB305095	EF550222	5479	nein
<i>Candida parapsilosis</i>	CaPa	AY055857	EU564205, EU564206		5499	ja
<i>Candida tropicalis</i>	CaTro	M55527	EU589208, EU288196, AY939810, AB305099	AAFN02000120	5472	ja
<i>Rhodotorula glutinis</i>	RhoGlu	X69853	AY188373, FJ345357	AY646097	5571	ja
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	RhoMu	DQ386306	HQ702343, DQ386306	DQ832198	3729	nein
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SaCe	AY251630	AM262830	AY048154	3206	ja
<i>Trichosporon cutaneum</i>	TriCu	X60182	EU863541, AB305103		2917	ja

Tabelle 10: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Hefen

Organismus	Abk	18S	ITS Bereich	28S	Bp	Genom
<i>Absidia corymbifera</i>	AbCo	AF113407	AB305110, FJ345350 DQ325462	FJ345350	5795	nein
<i>Absidia glauca</i>	AbGla	AF157118	AJ876491	AF157172, AJ876785	3156	nein
<i>Alternaria alternata</i> A7	AltAlt	AF218791	AF218791	DQ678082	3667	ja
<i>Alternaria citri</i>	AltCi	AY154705	AY154705	AY154705	1488	nein
<i>Alternaria mali</i>	AltMa		AB470849, AY154683, DQ912836, AY762945		1488	nein
<i>Alternaria tenuissima</i>	AltTe	AY154712	AY154712, FJ755199	FJ755193	1769	nein
<i>Aspergillus candidus</i>	AsCa	EU883597, AB002065	AY373843, FR727138	EF669609	2919	ja
<i>Aspergillus flavus</i>	AsFla	AF548060	AY939782, HQ856223, EU263602, HM222933	AF027863	2906	ja
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AsFu	AAHF01000017 M60300	HQ026746, EF634403	FJ358278	5675	ja
<i>Aspergillus nidulans</i>	EmNi	AB008403 X78539, U77377	EF652458, AJ937756	EU840227	3441	ja
<i>Aspergillus niger</i>	AsNi	DQ915806	EF634379, GQ229077	EF634379	5279	ja
<i>Aspergillus ochraceus</i>	AsOch	AB002068	GU358697, EF661420	EF661420	2977	nein
<i>Aspergillus penicillioides</i>	AsPe	AF548066	EF652037	EF652037	3645	nein
<i>Aspergillus restrictus</i>	AsRe	AB002079 AB008407	EF652043	EF652043	2923	ja
<i>Aspergillus sydowii</i>	AsSy	EU278600	AM883159, GQ229078	AM883159	2831	nein
<i>Aspergillus tamarii</i>	AsTa	AB106338	AF272579	AF272579	2929	nein
<i>Aspergillus terreus</i>	AsTe	AAJN01000138: 0 – 2801	EF669618, JF509458	EF669618	5632	ja
<i>Aspergillus ustus</i>	AsUs	AB008410 AB002072	EU709765, EF652492	EF652492	2932	ja
<i>Aspergillus versicolor</i>	AsVe	AB008411 AB002064	AY373880, AJ937751, HQ882798, GU586852	AJ937751	2912	nein
<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>var pullulans</i>	AuPu_var _pul	DJ062818	FR716139, FJ150911	FJ150941	2912	nein
<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>var melanigum</i>	AuPu_var _mel	EU009479	EU009479, GU475133	GU475134	2928	nein
<i>Botrytis cinerea</i>	BoFu	DJ062819	EF207415	AY544651	4609	ja
<i>Chaetomium globosum</i>	ChaGlo	DJ062820	FN868476, AB449671, GQ428202	AAFU01000612	5499	ja
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	ClaCla	AY251093	GQ458030, AY251074	GU214409	5619	nein
<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	ClaSph	AY251098	AF455481, AY251077	GU017542	3579	nein
<i>Cladosporium carrionii</i> (syn. <i>Cladophialophora</i> )	ClaCa	FJ358302 AY554285	AF050262, AJ853753	FJ358234	4068	nein
<i>Cladosporium herbarum</i> ( <i>Davidiella tassiana</i> )	ClaHer	EU167558	AF393706, DQ289799, EU167558	DQ289799 , GU214410	5448	nein
<i>Engyodontium album</i>	EnAl	AY251098	AB106650, DQ780351	GU017542	3618	nein
<i>Eurotium amstelodami</i>	EuAm	AB002076	FR848825	FR848825	3189	nein
<i>Eurotium rubrum</i>	EuRu	U00970	EF652067	EF652067	3663	nein
<i>Aspergillus Rubrum</i>						
<i>Fusarium culmorum</i>	FuCu	AF548073	DQ459870	DQ459870	2809	ja
<i>Fusarium oxysporum</i>	FuOx	AB110910	DQ535184	DQ535184	3413	ja
<i>Fusarium solani</i>	FuSo	EF397944	FJ345352	FJ345352	5569	ja

Tabelle 11: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Schimmelpilze I

Organismus	Abk	18S	ITS Bereich	28S	Bp	Genom
<i>Fusarium verticillioides</i> ( <i>Gibberella moniliformis</i> )	FuVe	HM165488	AY188916, EU364867	AY188916	2857	nein
<i>Geotrichum candidum</i> / <i>Galactomyces geotrichum</i>	GaGe	X69842 U00974	GQ376093, GQ458034	GQ458034	4611	nein
<i>Mucor racemosus</i>	MuRa	AJ271061	HQ010438, FJ345353, AJ271061	HQ010438, FJ345353	6510	nein
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	PaLi	AB103380	AB103380	EF468844	3180	nein
<i>Paecilomyces variotii</i>	PaVa	AB023948	FJ345354, AF033395	AF033395, FJ345354	5586	nein
<i>Penicillium brevicompactum</i>	PeBre	AF548085	AF125943	FJ890399	3192	nein
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PeChr	HQ882177	GQ458038, HQ882177, GU565149, GU325676	GQ458038	2884	ja
<i>Penicillium commune</i>	PeCo	AF236103	AF236103, GQ458026	GQ458026	2932	nein
<i>Penicillium expansum</i>	PeEx	AB028137	DQ339556, HQ225715	AF003359	4057	nein
<i>Penicillium funiculosum</i>	PeFu	AF245267	HM469427, GQ221866	HM017065	2968	ja
<i>Penicillium glabrum</i>	PeGla	AF245270	EF200097	EF200097	2922	nein
<i>Penicillium griseofulvum</i>	PeGri	EF607282	DQ339553	AB470601	3205	ja
<i>Penicillium purpurogenum</i>	PePur	AF245268	EU427301	EF087978	2965	ja
<i>Penicillium verruculosum</i>	PeVer	AF510496	HM469420, AF510496	AF510496	5520	nein
<i>Rhizopus oryzae</i>	RhiOr	GU126375	AB109758	AY213624, HQ435045	3341	ja
<i>Rhizopus stolonifer</i>	RhiSto	DQ536474	AM933543, AY625075, FN401528	DQ273817	5695	ja
<i>Stachybotrys chartarum</i>	StaCha	AY489680, AY489682, AF548096	AF081469, AF216649, AF206273	AY489712	3631	nein
<i>Trichoderma harzianum</i> ( <i>Hypocrea lixii</i> )	tDerHar	HM466917	HQ608137, EF488144	GQ328856, HM466680	3607	ja
<i>Trichoderma viride</i> ( <i>Hypocrea rufa</i> )	tDerVir	AJ301991	AJ301991	AY489726	3666	ja
<i>Wallemia sebi</i>	WaSe	AY741380	AY328913	DQ847518	3741	nein

Tabelle 12: Verteilung der rRNA Sequenzen in Datenbanken - Schimmelpilze II

Organismus	Abk	18S	ITS Bereich	28S	Bemerkung
D <i>Acremonium alternatum</i>	AcAlt	AY083232	GQ377488	FJ176883	keine Verb zw. 18S und ITS
H <i>Acremonium kiliense</i>	AcKi				rRNA Bereiche nicht in DB
S <i>Acremonium murorum</i>	AcMu	EU326188	FJ176824	FJ176880	rRNA Bereiche nicht in DB
S <i>Acremonium strictum</i>	AcStri	GU219468	FJ176879		keine Verb zw. 18S und ITS
S <i>Aspergillus caesiellus</i>	AsCae		EF652044, AY373865, AY214440	EF652044	18S rRNA nicht in DB
S <i>Chaetomium brasiliense</i>	ChaBra		GU183109		18S Bereiche nicht in DB
S <i>Chaetomium murorum</i>	ChaMu		...		18S Bereiche nicht in DB
S <i>Eurotium chevalieri</i>	EuChe		EF652072, HM116371	EF652072	18S nicht in DB
S <i>Hormoconis resinae</i> ( <i>Amorphotheca resinae</i> )	HoRe		AF393726, EU040230	EU030280	keine 18S in DB
S <i>Mucor plumbeus</i>	MuPlu		EU484262, EU484245		keine Verb zw. 18S und ITS
S <i>Oidiodendron griseum</i>	OidGri		AY624310, AF062797, AY618676		rRNA Bereiche nicht in DB
S <i>Penicillium aurantiogriseum</i> ( <i>Penicillium aurantiovirens</i> )	PeAu		AF033476	AF003355	18S nicht in DB
S <i>Penicillium digitatum</i>	PeDi		AY373910, AB479307, AF033471		keine Verb zw. 18S und ITS
S <i>Penicillium marneffei</i> (RK3)	PeMa		AB353909, AB298970		Genom vorhanden, 28S fehlt
S <i>Penicillium piceum</i>	PePi	AY083221 GU477623	AY787846		keine Verb zw. 18S und ITS 28S nicht in DB
S <i>Phialophora fastigiata</i> ( <i>Cadophora fastigiata</i> )	PhiFa		FJ903336/DQ317326/ AB100625		18S nicht in DB
S <i>Phialophora heteromorpha</i>	PhiHe				keine eindeutige Daten
S <i>Phoma glomerata</i>	PhoGlo	AJ301711, AJ301701, AY293771	DQ912693, AY183371	EU754185 AY293784	keine Verb zw. 18S und ITS
S <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	ScoBre		AJ853776		keine Verb zw. 18S und ITS
S <i>Scopulariopsis fusca</i>	ScpFu				keine Daten in DB
S <i>Syncephalastrum racemosum</i>	SynRa				Genom vorhanden
S <i>Trichophyton violaceum</i>	TriVi	EF631624	EU590656, AB194246, AJ270812		28S nicht in DB
S <i>Verticillium</i> / <i>Lecanicillium lecanii</i>	LeLe		EF464584, GU183118, AY283556	AF049156, AF339605	

Tabelle 13: nicht assemblierte Sequenzeinträge

## Anlage: Teil 3

Darstellung des Ausgangsbaumes aus Kapitel 4.4. Zu sehen ist ein gewurzelter, binärer, phylogenetischer Baum, der alle 76 recherchierten Organismen, aus den Gruppen der Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze, enthält. Die Organismen sind in der bereits beschriebenen Kurzschreibweise gezeigt und können anhand der vorherigen Tabellen zugeordnet werden.

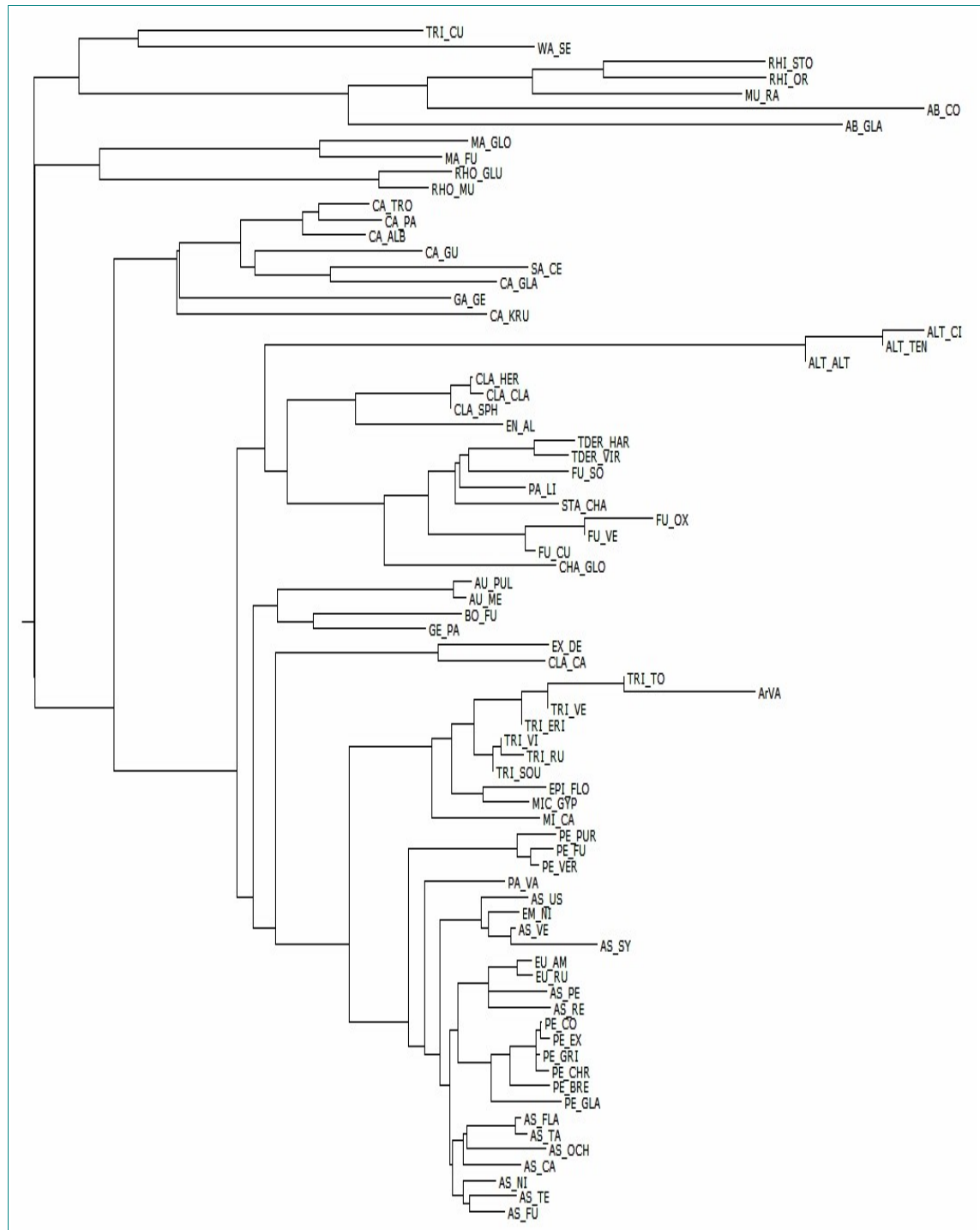


Abbildung 21: phylogenetischer Baum aller assemblierten Organismen



## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Bašková, L., C.Landlinger, S.Preune, T.Lion: The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. In: The Journal of Medical Microbiology 56(Pt 9): 2007, p. 1167-1173, (PMID: 17761478)
- [2] Benson,D.A., Karsch-Mizrachi,I., Lipman,D.J., Ostell,J. and Wheeler,D.L. : GenBank. In: Nucleic Acids Research Vol. 39: 2011, D32–D37
- [3] Blackwell, M.,Hibbett, D.S.: Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). In: Mycologia 98(6): 2007, p. 829 – 837.
- [4] Cardio, D. E.,Lucke, K., Imhof, A., Bloemberg,G.V. and Böttger, E.C.: Systematic Internal Transcribed Spacer Sequence Analysis for Identification of Clinical Mold Isolates in Diagnostic Mycology: a 5-Year Study, In: Journal of clinical Microbiology 48(8): Aug. 2010, p. 2809–2813
- [5] Chang, H.C., Leaw, S.N., Huang, A.H., Wu, T.L., Chang, T.C.: Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. In: Journal of clinical Microbiology 39(10): 2001, p. 3466–3471. (PMID: 11574557 )
- [6] Chen,Y.C., Eisner,J.D.,Kattar, M. M., Rassouliau-Barett, S. L.,LaFe,K., Yarfitz, S.L, Limaye, A.P. andCookson, B.T.: Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence poly-morphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. In: Journal of clinical Microbiology 38(6): 2000, p. 2302–2310, (PMID: 10834993)
- [7] Coignard, C., S.F. Hurst, L.E. Benjamin, M.E. Brandt, D.W. Warnock, C. J. Morrison: Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. In: Journal of clinical Microbiology 42(2): 2004, p. 858–861, (PMID: 14766873 )
- [8] De Aguirre, L., S.F. Hurst, J.S. Choi, J.H. Shin,H.P. Hinrikson, C.J. Morrison: Rapid Differentiation of *Aspergillus* Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay. In: Journal of clinical Microbiology 42(8):2004, p.3495–3504
- [9] De Baere, T., G.Claeys, D.Swinne, C.Massonet, G.Verschraegen, A.Muylaert, M.Vaneechoutte: Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region. In: BMC Microbiology 2: 2002, p. 21 –27,



- PMID: 12139769 )
- [10] Ebihara M, Makimura K, Sato K, Abe S, Tsuboi R: Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. In: The British journal of dermatology 161(5): Nov 2009, p. 1038-44. (PMID: 19566663 )
- [11] Erickson, H.P. and D. Stoffler: Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. In: The Journal of cell biology 135(1): 1996, p. 5-8, (PMID: 8858158 )
- [12] Ghannoum, M.A., R.J. Jurevic, P.K. Mukherjee, F. Cui, M. Sikaroodi, A. Naqvi, P.M. Gillevet: Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. In: PLoS Pathogens 6 (1):2010, p. 1-8, (PMID:20072605)
- [13] Graeser, Y., M.El Fari, R.Vigalys, A.F.A.Kuijpers, G.S. de Hoog, W.Presber, H.-J.Tietz: Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. Medical Mycology 37 (2):April 1999, p. 105-114, (PMID: 10361266 )
- [14] Hawksworth, D.L., A.Y. Rossman: Where are all the undescribed fungi? In: Phytopathology 87(9): Sep. 1997, p. 888-891, (PMID: 18945058)
- [15] Hebert, P.D.N., E.H. Penton, J.Burns, D.H.Janzen, W.Hallwachs: Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. In: Proceedings of the National Academy of Science USA 101(104): 2004, p. 14812-14817, (PMID: 15465915)
- [16] Henry, T., P.C.Iwen, S.H.Hinrichs: Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. In: Journal of clinical Microbiology 38(4):Apr. 2000, p. 1510–1515, (PMID: 10747135)
- [17] D.S. Hibbett et al.: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. In: Mycological research 111(Pt5): 2007, p. 509–547, (PMID: 17572334 )
- [18] Hinrikson, H. P., S. F.Hurst, T. J.Lott, D.W.Warnock, C.J.Morrison: Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. In: Journal of clinical Microbiology 43(5): Mai 1995, p. 2092–2103. (PMID: 15872227)
- [19] Hof, H.: *Candida, Aspergillus und Co: Pathogene Pilze. Pharmazie in unserer Zeit* 32(2): 2003, p. 96–103, (PMID: 12677961)

- [20] Krisai-Greilhuber: Phylogenie der Pilze. In: Denisia: Evolution – Phänomen Leben: 2007, p. 351- 366
- [21] Korabecna, M.: The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology 2: 2007, p. 783-787
- [22] Khot, P.D., D.L Ko, D.N Fredricks: Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. In: Applied and environmental microbiology 75(6): 2009, p1559-1565, (PMID: 19139223)
- [23] Landlinger, C., S.Preuner, B.Willinger, B.Haberpursch, Z.Racil, J.Mayer, T.Lion: Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology. In: Journal of clinical Microbiology 47(4): Apr. 2009, p. 1063–1073, (PMID: 19244466 )
- [24] Landlinger, C., L.Baskova, S.Preuner, B.Willinger, V.Buchta, T.Lion: Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region. In: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases28: 2009, p. 613-622
- [25] Larkin, M.A., G.Blackshields, N.P.Brown, R.Chenna, P.A.McGettigan, H.McWilliam, F.Valentin, I.M.Wallace, A.Wilm, R.Lopez, J.D.Thompson, T.J.Gibson, D.G.Higgins: ClustalW and ClustalX version 2.0. In: Bioinformatics Application Note 23(21): 2007, p. 2947-2948
- [26] Leaw, S.N., H.C. Chang, H.F. Sun, R. Barton, J.P. Bouchara, T.C. Chang: Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. In: Journal of clinical Microbiology 44(3): 2006, p. 693–699, (PMID: 16517841 )
- [27] Lenardon, M.D., C.A.Munro, N.A.Gow: Chitin synthesis and fungal pathogenesis. In: Current opinion in microbiology 13(4): 2010, p. 416-423, (PMID: 20561815)
- [28] Loeffler, J.,H.Hebart, R.Bialek, L.Hagmeyer, D.Schmidt, F.P.Serey, M.Hartmann, J.Eucker, H.Einsele: Contaminations occurring in fungal PCR assays.In: Journal of Clinical Microbiology 37(4): 1999, p. 1200-1202, (PMID: 10074553)
- [29] Lomako, J., W.M.Lomako, W.J.Whelan: Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. In: Biochimica et Biophysica acta 1673(1-2): 2004, p. 45-55 (PMID 15238248)

- [30] Man, S.M., N.O.Kaakoush, S.Octavia, H. Mitchell: The Internal Transcribed Spacer Region, a New Tool for Use in Species Differentiation and Delineation of Systematic Relationships within the *Campylobacter* Genus. In: *Applied and environmental microbiology* 76(10): 2010, p. 3071–3081, (PMID: 20348308 )
- [31] De Pauw, B., T.J.Walsh, J.P.Donnely, D.A.Stevens, J.E.Edwards, et al: Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46(12): 2008, p. 1813-1821, (PMID: 18462102)
- [32] PEAY, K.G., P.G. Kennedy. T.D. Bruns: Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience* 58(9): 2008, p. 799-810
- [33] Rieth H (1967) D-H-S-Diagnostik. *Fortsch Med* 85: 594.
- [34] Ryberg, M., E.Kristiansson, E.Sjökvist, R.H.Nilsson: An outlook on the fungal internal transcribed spacer sequences in GenBank and the introduction of a web-based tool for the exploration of fungal diversity. In: *The new Phytologist* 18(2): 2008, p. 471-477, (PMID: 19121041 )
- [35] SCHMIT J.P. & G.M. MUELLER: An estimate of the lower limit of global fungal diversity. In: *Biodivers Conserv* 16: 2007, p. 99-111
- [36] Tsukihara, T., H.Aoyama, E.Yamashita, T.Tomizaki, H.Yamaguchi, K.Shinzawa-Itoh, R.Nakashima, R.Yaono, S.Yoshikawa: The Whole Structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. In: *Science* 272(5265): 1996, p. 1139-1145, (PMID: 8638158)
- [37] Turenne, C.Y., S.E.Sanche, D.J.Hoban, J.A.Karlowsky, A.M.Kabani: Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. In: *Journal of clinical Microbiology* 37(6): 1999, p.1846–1851, (PMID: 10325335)
- [38] Wade, R.H.: Microtubules: An overview. In: *Methods in molecular medicine* 137: 2007, p. 1-16, (PMID: 18085218)
- [39] White, T.J., T.Bruns, S.Lee, and J.Taylor: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: N.Innis, D.Gelfand, J.Sninsky, T.White (ed.): *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York, p. 315-322.

- [40] P. Lewis White, S.Bretagne, L.Klingspor, et al: Aspergillus PCR: One Step Closer to Standardization. In: Journal of clinical Microbiology 48(4): Apr. 2010, p. 1231–1240, (PMID: 20147637)
- [41] Zhao, J., F.Kong, R.Li, X.Wang, Z.Wan, D.Wang: Identification of Aspergillus fumigatus and Related Species by Nested PCR Targeting Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions. In: Journal of clinical Microbiology 39(6): 2001, p. 2261-2266, (PMID: 11376067)
- [42] Madigan, Michael T. ; Martinko, John M.: Brock : Mikrobiologie. 11. überarbeitete Auflage München: Pearson Studium, 2006
- [43] Gibas, C. ; Jambeck, P.: Einführung in die Praktische Bioinformatik. 1. Auflage Köln: O'Reilly Verlag GmbH & Co. KG, 2002
- [44] Graw, Jochen: Genetik. 4., vollständig überarbeitete Auflage Berlin : Springer Verlag, 2006
- [45] Hahn, H.; Falke, D.: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 4. Auflage Berlin : Springer Verlag, 2001
- [46] Kappstein, I.: Nosokomiale Infektionen: Prävention- Labordiagnostik-Antimikrobielle Therapie. 4., vollständig neu bearbeitete Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag, 2009, S. 374
- [47] Mücke, W.; Lemmen, C.: Schimmelpilze – Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage, Landsberg am Lech: ecomed MEDIZIN, 2004, S.18/S.13
- [48] Noli, C.; Scarampella, F.: Praktische Dermatologie bei Hund und Katze. 2., unveränderte Auflage Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH Co. KG, 2005
- [49] Pingoud, A.; Urbanke, C.: Arbeitsmethoden der Biochemie. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 1997. S.133
- [50] Verlagsredaktion: Pschyrembel : Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2002
- [51] Munk, K., Requena, N., Fischer, R.: Taschenlehrbuch Biologie: Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2008
- [52] Aida, Ibricevic: Aufbau und Evaluation eines diagnostischen PCR-Verfahrens zum Nachweis von spezifischer Paracoccidioides brasiliensis- DNA – 2006. – S. 15 Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, medizinische Fakultät, Dissertation, 2006

- [53] Beifuß, Barbara: Etablierung einer molekularen Sofortdiagnostik von Dermatophyten auf Speziesebene aus nativem Material von Patienten mit Hautmykosen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Real-time PCR (LightCycler) – 2008 – S. 2-11 Ludwig-Maximilians-Universität München, Medizinischen Fakultät, Dissertation, 2008
- [54] Dirk Steinke & Nora Brede: Taxonomie des 21. Jahrhunderts? Johann Wolfgang Goethe-Universität Konstanz, Ökologie & Evolution – 2008 – S.1-16, Manuskript für Biologie in unserer Zeit
- [55] Werner, Stefan: Untersuchungen zur Regulation und Bedeutung der Chitin-Synthese beim Maispathogen *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. (Teleomorph: *Glomerella graminicola* POLITIS) – 2002. - S.6-16,84-85 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Dissertation, 2002
- [56] Joseph Spatafora <E-Mail: [spatafoj@science.oregonstate.edu](mailto:spatafoj@science.oregonstate.edu)>: Assembling the fungal tree of life. URL: <<http://www.aftol.org>> Verfügbar am 20.8.2011
- [57] Greifenberg, S.: Aflatoxine. URL: <<http://www.chemgapedia.de/vsengine/tra/vsc/de/ch/8/bc/tra/biotoxine.tra/Vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biotoxine/myko/toxine.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biotoxine/aflatoxine.vscml.html>> Verfügbar am 20.8.2011
- [58] Verfasser unbekannt. ClustalW2 multiple sequence alignment –Introduction. URL: <<http://www.ebi.ac.uk/2can/tutorials/protein/clustalw.html>> Verfügbar am 20.8.2011
- [59] Joseph Felsenstein: Phylip. URL: ><http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/general.html>< Verfügbar am 20.8.2011
- [60] Daniel Müller, Nachweis von 27 Hausfäulepilzen mittels DNA-Chiptechnologie. URL: >[http://www.biotype.de/fileadmin/user/Paper/Holztechnologie\\_2\\_2010.pdf](http://www.biotype.de/fileadmin/user/Paper/Holztechnologie_2_2010.pdf)< Verfügbar am 20.8.2011
- [61] Waldemar Schlundt, Molekulare und biochemische Ursachen neuraler Krankheiten - Alzheimersche Krankheit, 2010 URL: ><http://www.arndbaumann.de/veranst/krankhws/pdf/alzhei.pdf> Verfügbar am 20.8.2011
- [62] Sascha Thewes, Einführung in die Mikrobiologie – Pilze, Institut für Biologie – Mikrobiologie URL: ><http://www.biocircle.fu-berlin.de/mikrobio2/dokumente/pilzvorlesungst.pdf>< Verfügbar am 20.8.2011

- [63] Willinger, B.: Diagnostik invasiver Pilzinfektionen. URL: ><http://infektiologie-hygiene.universimed.com/artikel/diagnostik-invasiver-pilzinfektionen><  
Letztes Update: 11 November, 2007 - 01:00
- [64] Sandra Preuner, Thomas Lion >E-Mail: thomas.lion@labdia.at< : Diagnostik invasiver Pilzinfektionen - Probleme und Perspektiven. URL:  
><http://haematologie-onkologie.universimed.com/artikel/diagnostik-invasiver-pilzinfektionen-probleme-und-perspektiven>< Letztes Update: 26 Juli, 2010
- [65] Schabereiter-Gurtner, C.>E-Mail: Schabereiter-Gurtner@ingenetix.com< :  
Nachweis von Pilzinfektionen: Standardisierung der Real-Time-PCR. URL:  
><http://infektiologie-hygiene.universimed.com/artikel/nachweis-von-pilzinfektionen-standardisierung-der-real-time-pcr>< Letztes Update: 10.  
Februar, 2011 - 16:00
- [66] M. Blackwell >E-Mail: mblackwell@lsu.edu<, R.Vilgalys, T.Y.James,  
J.W.Taylor: Fungi - Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts,  
smuts, etc. URL: ><http://tolweb.org/fungi>< ><http://tolweb.org/Eukaryotes><  
Verfügbar am 20.8.2011
- [67] Verfasser unbekannt: The tree of Life Web Projekt. URL:  
><http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>< Verfügbar am 20.8.2011
- [68] Vilgalys lab : Conserved primer sequences for PCR amplification and  
sequencing from nuclear ribosomal RNA >URL:  
><http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>< Update: 18.  
Dezember 2001 16:42:01

Programmquellen

- [P1] CLC Workbench: <http://www.clcbio.com/>
- [P2] ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- [P3] Phylip: <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>  
Archaeopteryx 0.955 beta (Phylogenetic Tree Viewer)
- [P4] Primer Pro: <http://www.changbioscience.com/primo/primo.html>
- [P5] NCBI-Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [P6] Emerencia: <http://andromeda.botany.gu.se/emerencia.html>  
[#genus\\_search](#)
- [P7] ArbSilva: <http://www.arb-silva.de/search/>

## 10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 22.August.2011

---

Doreen Kropp